



TITLE:

MAP kinaseカスケードにおける分子間相互作用の解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

田ノ上, 拓自

CITATION:

田ノ上, 拓自. MAP kinaseカスケードにおける分子間相互作用の解析. 京都大学, 2001, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183079>

RIGHT:

主論文

MAP kinase カスケードにおける分子間相互作用の解析

田ノ上拓自

目次

	ページ
1, 目次	1
2, 要旨	2-3
3, 序論	4-11
4, 方法	12-14
5, 結果	15-28
6, 考察	29-35
7, 引用文献	34-43
8, 謝辞	44

要旨

MAP kinase カスケードは真核生物界で広く保存されているシグナル伝達経路の module の一つであり、細胞の機能において非常に重要な役割をはたす。MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), MAP kinase kinase (MAPKK), MAP kinase, の3段階のキナーゼによって構成される。MAP kinase は、MAPKK、MAPKAPK (MAP kinase activated protein kinase)、転写因子、MAPK-phosphatase などの多くの分子と相互作用をし、リン酸化、脱リン酸化といったかたちでシグナルを受け渡す。しかし、細胞内には様々なシグナル伝達経路が存在し、かつ、MAP kinase カスケードにも ERK、p38、JNK/SAPK、ERK5、の4つのカスケードが存在する。これらのカスケードが細胞内で不必要なクロストークを防ぎつつ、正確に効率良くシグナルを伝達することが細胞の機能にとって不可欠であるが、そのための分子機構に関する研究は緒についたばかりである。本研究において、私は MAP kinase と相互作用する分子群の一次配列上に保存されている、MAP kinase 結合部位を同定し、かつその結合部位に対応する、MAP kinase 上の結合部位も同定した。いずれも酵素の活性中心からは離れた部分に存在する。よって、MAP kinase カスケードにおける分子間の結合は、酵素の活性中心を介する相互作用とは異なる性質を持つと考えられる。この結合を docking interaction と呼ぶ。MAP kinase 分子の docking site は groove 状の構造をしており、docking groove と命名した。MAP kinase と相互作用する分子はこの docking groove を介して結合し、docking groove を構成するアミノ酸の種類および配置が結合の特異性および強さを規定しているものと考えられる。その例として、docking groove 内の電荷を持つアミノ酸の数と配置によって docking interaction の特異性が ERK2 と p38 の間で変換される例をいくつか示した。上流の活性化因子である MAPKK、不活性化因子である MAPK-phosphatase、および基質である MAPKAPK は MAP kinase 上の共通の領域 (docking groove) に結合する。よって、docking groove を介する docking

interaction が MAP kinase カスケードにおける、上流の分子から下流の分子へのシグナルの流れを規定していることが考えられる。

序論

細胞は、外界からの刺激に応答して、様々な反応を示す。例えば、増殖、形態変化、分化、アポトーシスなどである。これらの細胞応答は、遺伝子発現パターンの変化、細胞骨格系の変化などに還元できるが、外界からの刺激をこれらの変化へと結び付ける役割をはたすシステムが細胞内情報伝達機構である。細胞内でシグナルを伝達するシステムとして、cAMP などのセカンドメッセンジャーによる伝達機構、プロテアーゼのカスケードによる伝達機構、タンパク質のアセチル化による伝達機構などがあるが、なかでも、タンパク質のリン酸化による情報伝達機構は、非常に一般性のあるシステムとしてほとんどあらゆる細胞応答に関与している。

MAP kinase (Mitogen Activated Protein kinase) カスケードは、MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), MAP kinase kinase (MAPKK), MAP kinase, の3段階のキナーゼからなる細胞内情報伝達経路の module である。酵母から哺乳類まで、真核生物において広く保存されており、進化上、細胞外の刺激を核へと伝える機構として生み出された module の一つであると考えられる。哺乳類においては、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、などの細胞の機能に重要な役割を果たしている事が理解されつつある。MAPKKK が MAPKK をリン酸化し、活性化し、MAPKK が MAPK をリン酸化し、活性化する (図 A)。MAP kinase 分子には、ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38, JNK/SAPK (c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase), ERK5/BMK1 (big MAP kinase) の4つのサブファミリーが存在し、ERK および ERK5 は主に細胞増殖刺激によって活性化され、p38, JNK/SAPK は主にストレス刺激や炎症性サイトカインによって活性化される (Sturgill and Wu 1991; Ahn et al. 1992; Nishida and Gotoh 1993; Marshall 1995; Kyriakis and Avruch 1996; Treisman 1996; Robinson and Cobb 1997; Ip and Davis

1998; Schaeffer and Weber 1999)。MAPKK は、哺乳類において 7 種類報告されており、活性化する MAP kinase に特異性がある。MEK1,2 は ERK を活性化し、MKK3、MKK6 は p38 を活性化し、SEK1、MKK7 は JNK/SAPK を活性化する MAPKK である。また、MEK5 は ERK5 を活性化する。MAPKK は MAP kinase 分子の P-loop のスレオニンおよびチロシンをリン酸化し、活性化する (図 B)。MAP kinase 上のリン酸化されるスレオニンおよびチロシンの位置はファミリー間で保存されており、ERK および ERK5 は TEY、p38 は TGY、SAPK/JNK は TPY 配列がリン酸化される。MAP kinase の活性化にはこのスレオニンおよびチロシンの両方がリン酸化されることが必要である。

MAP kinase kinase kinase は MAPKK をリン酸化し、活性化するセリン／スレオニンキナーゼである。分子量は比較的大きく、様々な分子との相互作用が予想される。また、キナーゼドメイン以外の部分は多様性に富んでおり、MAP kinase を活性化する刺激の多様性を反映しているものと考えられるが、上流の分子、もしくは刺激が同定されている MAPKKK は少ない。良く知られている例としては、EGF レセプターや FGF レセプターなどのレセプター型チロシンキナーゼの下流で Ras が活性化され、それとともに MAPKKK 分子の一つである Raf が活性化し、活性化した Raf が MAPKK である MEK をリン酸化し、MEK が ERK をリン酸化し活性化する。しかし、Ras による Raf の活性化機構は正確には解明されていない。MAPKKK は MAPKK 以外の基質をリン酸化することも報告されており、それぞれの役割および活性化機構の解明は今後の研究の課題の一つである。

MAP kinase は活性化されると細胞内で様々な基質をリン酸化し、その機能を制御する。良く知られている基質としては、転写因子群と kinase 群 (MAPKAPK 群 (MAP kinase activated protein kinase)) が存在する。ERK は Elk1、Sap1a といった転写因子をリン酸化し、その転写活性化能を制御する。p38 と ERK5 の基

質となる転写因子としては MEF2 ファミリーが良く知られている。また、JNK/SAPK は c-Jun をリン酸化する。いずれも基本転写因子であったり、細胞分化に必須な転写因子であったりする。MAPKAPK 群には、ERK によって活性化されるものと p38 によって活性化されるもの、およびその両方によって活性化されるものが存在する。活性化された MAPKAPK は細胞内でさまざまな基質をリン酸化する。例えば、RSK2 は EGF 刺激によって ERK によってリン酸化され、活性化し、ヒストン H3 をリン酸化しクロマチンの構造に変化をもたらす転写を促進する。また、MAPKAPK2,3 は p38 によって活性化され、Hsp27 をリン酸化し、細胞骨格を制御する。

MAP kinase は活性化の強度や時間によって細胞に大きな影響をおよぼす。例えば PC12 細胞における神経分化の系において、NGF 刺激による神経分化に ERK の活性化が必要であり、かつ活性が持続するが、EGF 刺激によっては活性化が一過性であり、かつ細胞は神経突起を伸ばさない。このように MAP kinase はその活性化のみならず不活性化も非常に重要なものであり、厳密に制御されている。MAP kinase を不活性化する分子として、tyrosine phosphatase、dual specificity phosphatase、PP2C が報告されている。MAP kinase は先に述べたように MAPKK によるリン酸化部位のスレオニンおよびチロシンの両方がリン酸化することがその活性化には必要であるので、スレオニンもしくはチロシンが脱リン酸化されることによって不活性化される。tyrosine phosphatase としては、STEP、PTP-SL など、レセプター型もしくは細胞質型の 2 種類報告されており、ERK および p38 を不活性化する。dual specificity phosphatase とは、チロシン残基およびセリン／スレオニン残基の両方を脱リン酸化する能力をもつ phosphatase であり、MAP kinase に特異的な dual specificity phosphatase としては現在 9 種類報告されている (Camps et al. 2000; Keyse 2000)。ERK 特異的なもの、p38 および JNK/SAPK 特異的なもの、および ERK、p38、JNK/SAPK のすべてを

不活性化するものの3つのグループにわけることができる。dual specificity phosphatase は増殖刺激などによって転写が誘導されるものが多いが、その誘導には MAP kinase の活性化が必要である場合が多く、MAP kinase カスケードにおける負のフィードバック機構を担っているものと考えられる。PP2C は酵母および哺乳類において p38 (Shiozaki and Russel 1995; Takekawa et al. 1998; Nguyen and Shiozaki 1999; Takekawa et al. 2000) を不活性化するという報告があり、例えば、PP2C の一種である Wip1 は p53 によって発現が誘導され、p38 のリン酸化されたスレオニンを脱リン酸化するという報告がある。

細胞内には数多くのタンパク質が存在し、それぞれが適切な時と場所で適切な相手に対してリン酸化などの作用を働かせる。細胞内でのタンパク質の相互作用が正確に働くことによって細胞は様々な刺激に反応することが可能となり、ひいては個体レベルでの活動を保証する。近年のシグナル伝達分野の大きな進展の一つとして、SH2 や PDZ ドメインなどに代表されるドメイン構造の発見が挙げられる。細胞内のタンパク質はドメインを介して他のタンパク質と結合し、シグナルを受け渡す。ドメイン内のアミノ酸の配置や組み合わせによって結合の特異性および強度が規定され、シグナルの流れ方を決定する (Pawson 1995; Hunter 2000; Pawson and Nash 2000)。MAP kinase においては、キナーゼドメイン以外には既知のドメイン構造をもたず、かつ、その3次元構造は globular なものであり、特徴的な構造を示さない (Zhang et al. 1994; Wilson et al. 1996; Wang et al. 1997; Xie et al. 1998)。しかしながら、MAP kinase カスケードは、多くの分子を含んだ独立したシグナル伝達のモジュールと考えられる。よって、カスケードに内在的に、シグナルの受け渡しの正確さと効率を保証する分子的機構が存在するはずである。MAP kinase cascade に関して概説したように、MAP kinase cascade 内において酵素反応に特異性が存在する。例えば、MEK1 は ERK

を活性化するが、p38 や JNK/SAPK は活性化しない。また、MAP kinase は転写因子をはじめ、数多くの基質をリン酸化するが、MAP kinase ファミリー分子間で基質に対する特異性が厳密に存在する。例えば、ERK は MAPKAPK の一つである RSK をリン酸化するが、p38 および JNK/SAPK はリン酸化しない。さらに、MAP kinase のリン酸化配列である S/T-P 配列は多くのタンパク質に存在するが、そのすべてをリン酸化するわけではない。以上の理由から、MAP kinase カスケードにおける酵素反応にはその特異性を規定する要素が存在するはずである。MAP kinase カスケードにおける酵素反応の特異性は *in vitro* の系においても保証されている。例えば、大腸菌で発現し精製した MKK6 は、大腸菌で発現し精製した p38 を *in vitro* でリン酸化し、活性化するが、ERK および JNK/SAPK はリン酸化、活性化しない (Moriguchi et al. 1996; Moriguchi et al. 1997)。よって、それぞれの分子が構造上内在的に持っている特徴が酵素反応の特異性を規定していると考えられる。つまり、co-factor や scaffold 分子の存在は必要としないということである。最近の研究によって酵素反応の特異性と MAP kinase カスケードの分子同士の結合能に良い相関が存在することが明らかとなってきた (Bardwell and Thorner 1996; Fukuda et al. 1997; Muda et al. 1998; Pulido et al. 1998; Xia and Karin 1998; Gavin and Nebreda 1999; Holland and Cooper 1999; Jacobs et al 1999; Smith et al. 1999; Zuniga et al. 1999)。例えば、MEK1 は ERK2 と結合するが、その他の MAP kinase とは結合しない。また、ERK2 特異的な MKP-3 も ERK2 と結合するが、その他の MAP kinase とは結合しない。MEK1 および SEK1/MKK4 のアミノ末端側のキナーゼドメイン外の部分が ERK2 との結合部位であることが報告されており、また、MKP-3 の phosphatase domain 外のアミノ末端側のドメインが ERK2 との結合部位であることが知られている (Fukuda et al. 1997; Muda et al. 1998; Xia and Karin 1998)。MEK1 のアミノ末端側に関しては、N 端のメチオニンから 32 番目のアミノ酸までが ERK との結合に必要かつ十分であ

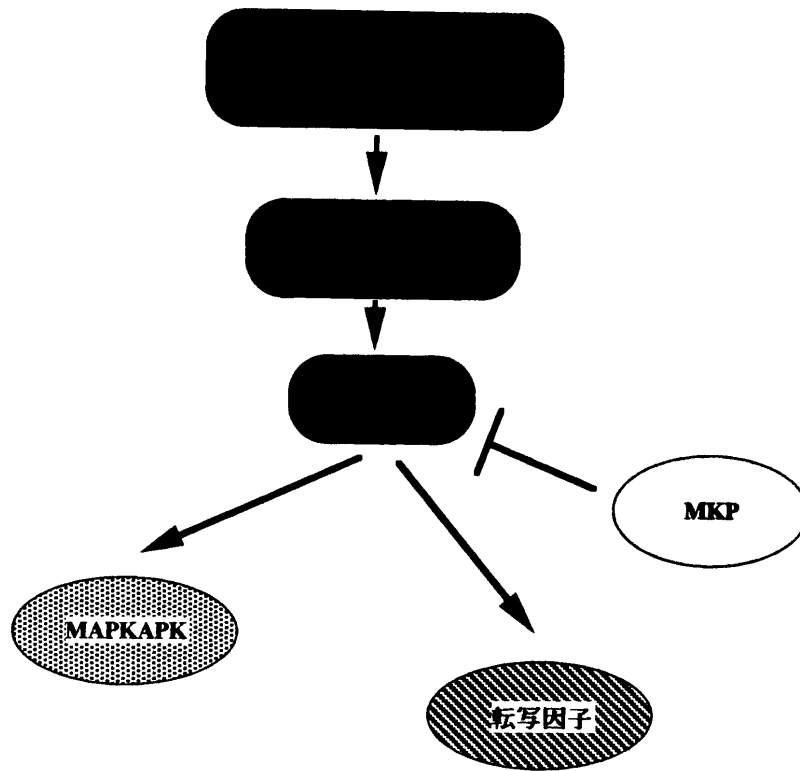
ることが報告されている (Fukuda et al. 1997)。SEK1/MKK4 では、1-87 番目までのアミノ酸が JNK/SAPK との結合部位として報告されている (Xia and Karin 1998)。MAPKK ファミリーの N 端の配列を比較すると、リジンやアルギニンといった正の電荷を持つアミノ酸のクラスターが保存されており、この部分が MAP kinase ファミリーとの相互作用に必要な部分ではないかと予想された (Bardwell and Thorner 1996; Holland and Cooper 1999)。また、MKP-3 に関しては、phosphatase domain 外の N 端側の 150 アミノ酸ほどの領域が ERK2 との結合に必要十分であり、この領域によって MKP-3 の ERK に対する特異性が規定されていることが報告されている (Muda et al. 1998)。MEK、MKP-3、いずれの場合も酵素活性部位とは離れた部分で結合することから、酵素と基質の酵素活性中心を介した相互作用とは全く違う様式で結合しているものと考えられる。この結合が酵素反応の特異性を規定していると考えられ、docking interaction と呼ぶ。

私は、p38 に結合する新規 dual specificity phosphatase、MKP-5 を two-hybrid screening によって cloning した (参考文献 (Tanoue et al. 1999))。一次配列上、MKP-5 のアミノ末端側のドメイン内に、MAPKK のアミノ末端側に存在するプラスの電荷を持ったアミノ酸のクラスターと相同な配列を見い出した。さらに、これと類似の配列を全ての dual specificity phosphatase の相同な部位に見い出した。この配列は、リジンやアルギニンといった正の電荷を持ったアミノ酸のクラスターおよびその前後に存在するロイシンやイソロイシンといった疎水性のアミノ酸によって特徴づけられる。驚くべきことに、報告されているすべての MAPKAPK (MAPK-activated protein kinase) にもこのような配列が見い出された。MAPKAPK においても MAPKK や MKP の場合と同様に酵素活性ドメイン (キナーゼドメイン) 外のカルボキシル末端に存在する。私は、この配列が MAP kinase の docking site として機能するのではないかと想定し、検討を加え、確か

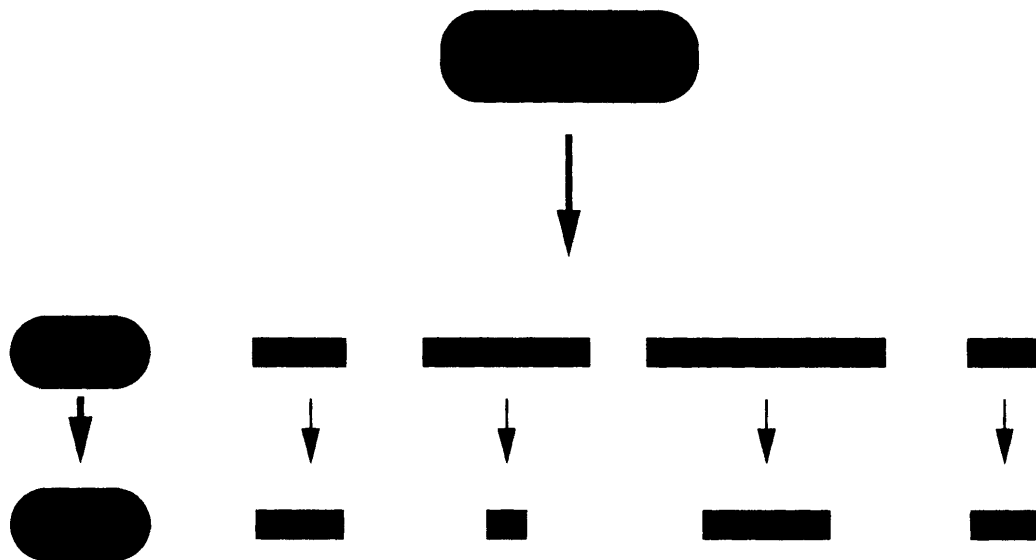
に docking site であることを示した。さらに、MAP kinase 側の docking site に関して検討した。MAP kinase と相互作用する分子の MAP kinase docking site が正の電荷によって特徴づけられ、かつ、酵素活性ドメインの外に存在することから、それに対応する MAP kinase 側の docking site は負の電荷のクラスターをもち、酵素活性ドメインの外に存在することが予想される。かつ、MAP kinase docking site が、結合する MAP kinase 分子の種類如何によらずある程度共通の配列を持っていることから、MAP kinase 側の docking site も MAP kinase 分子間である程度保存された配列であることが予想できる。私は、MAP kinase 分子のキナーゼドメイン外のカルボキシル末端側に、ファミリー間で保存された負の電荷のクラスターを見い出した。MAP kinase ファミリー分子の ERK2、p38 α 、JNK3 に関して立体構造が報告されているが、いずれにおいても、この負の電荷のクラスターはその側鎖が分子の表面に露出しており、キナーゼの活性中心から離れた部分に存在する (Zang et al. 1994; Wilson et al. 1996; Wang et al. 1997, Xie et al. 1998)。我々は、この領域が MAP kinase 上の docking site であることを示した。上流の活性化因子 (MAPKK)、下流の基質 (MAPKAPK)、さらに不活性化因子 (MKP) が MAP kinase 上の同一の部分を通じて docking interaction をすることから、MAP kinase 上の docking site を CD domain (Common Docking domain) と名付けた。さらに様々な MAPKAPK および MKP との docking interaction の解析から、MAP kinase 上の CD domain からすこし離れた部分 (ED site) を補助的な docking site として同定した。CD domain と ED site に存在する負のアミノ酸の数によって docking の specificity が規定される場合があることが明かとなったことから、docking interaction のそもそもの定義である specificity と efficiency を規定する領域として、CD domain と ED site を含む領域を MAP kinase 上の docking region (docking groove) として提唱した。Docking groove を介して活性化因子、不活性化因子、および基質と結合することから、docking groove が MAP kinase カ

スケードにおける serial な情報の受け渡しをも保証しているものと考えられる。

A



B



方法

使用したコンストラクト

MEK1、ERK2 は *Xenopus*、p38、3pk、MNK1、RSK2、PRAK、MSK1、2、MKP-5 は human、MKP-3、JNK2 は Rat、MKK6、SEK1 は mouse。培養細胞発現ベクターは pDL-SR α もしくは pMT ベクターを使用。大腸菌発現ベクターは pGEX(Pharmacia) ベクターを使用。

変異導入

すべての変異体は PCR 法によって作製した。PCR のポリメラーゼは pfu polymerase を使い、変異のはいった plasmid を制限酵素 Dpn1 処理で選択し、大腸菌に導入した。変異はシーケンスすることによって確認した。

細胞の培養法と遺伝子導入

NIH3T3 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium、10% calf serum で培養した。COS7 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium、15% fetal calf serum で培養した。 Δ B-Raf:ER cells (Pritchard et al. 1995) は Dulbecco's modified Eagle's medium、10% fetal calf serum、25 mM Hepes (pH 7.4)で培養し、fenol red は培地から除いた。細胞は 5% CO₂、37°C で保持した。細胞の遺伝子導入は Lipofectamine Plus (Gibco BRL)を使用した。

共発現免疫沈降

共発現した細胞 (60 mm dish) を 50 mM Hepes (pH 7.4)、10% glycerol、2 mM EGTA、2 mM MgC₂、1% NP-40、1 mM PMSF、20 μ g/ml aprotinin のバッファーもしくは 50 mM Hepes (pH 7.4)、2 mM EGTA、2 mM MgC₂、1 mM PMSF、20 μ g/ml

aprotinin.で溶解し、5 μ g の anti-c-Myc antibody (9E10) (Santa Cruz)、5 μ g の anti-HA antibody (12CA5)もしくは 5 μ g の anti-Flag antibody (Kodak) および protein A-Sepharose beads (25 μ l) (Pharmacia) と混合し、4°Cで2時間インキュベートした。免疫沈降物は2回溶解バッファーで洗い、結果はウエスタンブロット法を用いて検討した。

キナーゼアッセイ

細胞は 20 mM Tris-HCl、pH 7.5、12 mM 2-glycerophosphate、150 mM NaCl、1.5 mM $MgCl_2$ 、2 mM EGTA、10 mM NaF、1% TritonX-100、1 mM PMSF、1 mM sodium vanadate、20 μ g/ml aprotinin のバッファーで溶解し、タグのついたタンパク質をそれぞれのタグに対する抗体で免疫沈降した。免疫沈降物を TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、0.5 M NaCl、1 mM PMSF、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate、20 μ g/ml aprotinin)で2回洗い、Tris-バッファーで1回洗った。免疫沈降物をキナーゼ反応バッファー(20 mM Tris-HCl, pH 7.5、10 mM $MgCl_2$ 、100 μ M ATP (2 μ Ci [γ - 32 P]-ATP))中で基質と混合した。キナーゼ反応は 37°C で 15 分行った。反応は Laemmli's sample バッファーを加えることによって止めた。キナーゼ活性の定量は BAS 2500 (Fuji Film)で行った。

GST Pull-down

細胞は 50 mM Hepes (pH 7.4)、10% glycerol、2 mM EGTA、2 mM $MgCl_2$ 、1% NP-40、1 mM PMSF、20 μ g/ml aprotinin のバッファーで溶解した。溶解した細胞液を GST 融合タンパク質と GSH ビーズと混合し、6時間インキュベートした。結果はウエスタンブロット法を用いて検討した。

ERK2 と MEK1 の N 端ペプチド (1-15 番目) の EDC によるクロスリンク

GST-ERK2 (1mg) を MEK1 の N 端ペプチド(5mM)と、20mM HEPES pH 7.3、5mMEDC、5mM sulfo-NHS、のバッファー中、室温で 45 分間インキュベートした。反応は 50mM Tris-HCl pH 7.5 バッファーで止めた。

ウエスタンブロット法

サンプルを 10%アクリルアミドゲルで電気泳動した後、Polyvinylidene difulode 膜(Immobilon P, Millipore)にトランスファーした。膜を 3%BSA で希釈した抗体と 4°C で 12 時間インキュベートした後、0.5% Tween-TBS で洗い、5% skim milk で希釈した 2 次抗体 (HRP) (Amersham) と室温にて反応させ、ECL Western Blotting detection system (Amersham)を使用し発色した。結果は X 線フィルムにて検討した。

結果

MAP kinase カスケードを構成する分子における MAP kinase docking site の予想。

我々は、MAPKK ファミリーの N 末端に保存されているリジン、アルギニンといった正の電荷を持ったアミノ酸のクラスターを、新規にクローニングしてきた MAPK-phosphatase である MKP-5 の一次配列上に見い出した (参考文献 (Tanoue et al. 1999))。この配列と相同な配列をその他の報告されているすべての MKP ファミリー分子の相同な領域に見い出した (図 1)。さらに同様の配列を報告されているすべての MAPKAPK の配列にも見い出し、この配列が MAP kinase docking site であると予想をたてた (Table1, 図 2)。また、MAP kinase 側の docking site に関して考察した。MAP kinase と相互作用する分子の MAP kinase docking site が正の電荷によって特徴づけられ、かつ、酵素活性ドメインの外に存在することから (図 2A)、それに対応する MAP kinase 側の docking site は負の電荷のクラスターをもち、酵素活性ドメインの外に存在することが予想される。かつ、MAP kinase docking site が、結合する MAP kinase 分子の種類如何によらずある程度共通の配列を持っていることから、MAP kinase 側の docking site も MAP kinase 分子間である程度保存された配列であることが予想できる。我々は、MAP kinase 分子のキナーゼドメイン外のカルボキシル末端側に、ファミリー間で保存された負の電荷のクラスターを見い出した (図 2B)。MAP kinase ファミリー分子の ERK2、p38 α 、JNK3 に関して立体構造が報告されているが、いずれにおいても、この負の電荷のクラスターはその側鎖が分子の表面に露出しており、キナーゼの活性中心とは離れた部分に存在する (Zang et al. 1994; Wilson et al. 1996; Wang et al. 1997; Xie et al. 1998) (図 3)。よってこの領域は MAP

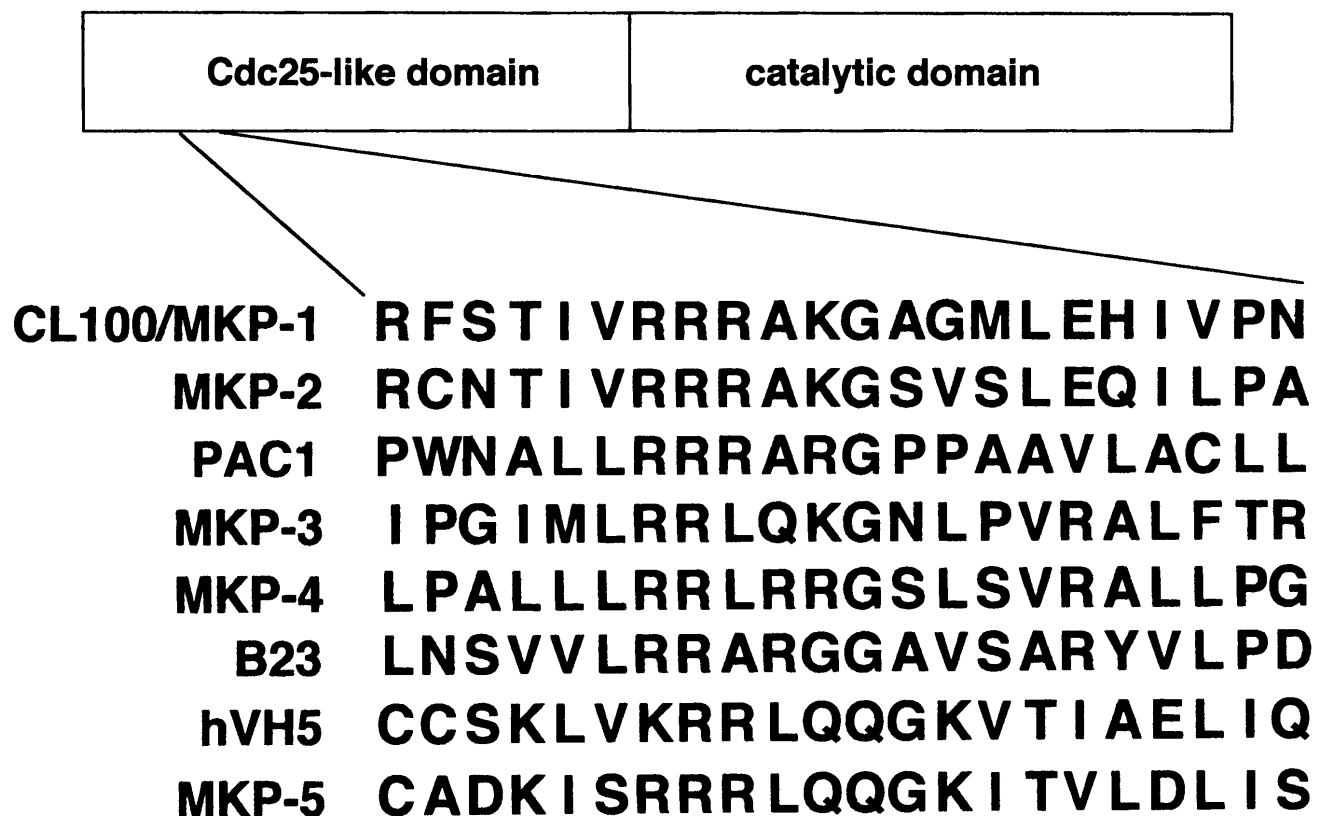


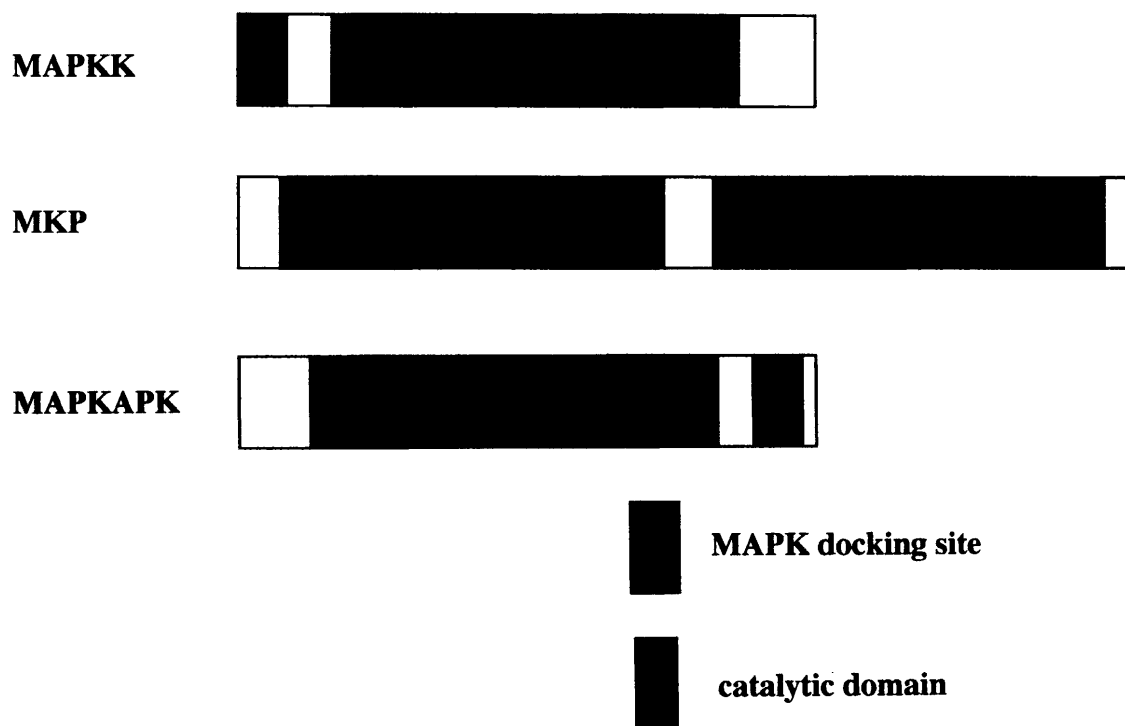
Figure 1 MKPファミリーに保存されているMAP kinase docking siteの配列。

MAPKK	MEK1	MPKKKPTPIQLNPNP	ERK/MAPK
	MEK2	MLARRKPVLPAITNP	
	MKK3	KGKSKRKDLRI	p38
	MKK6	SKGKKRNPGLKIP	
	SEK1/MKK4	QGKRKALKINF	JNK/SAPK, p38
	MKK7	EARRRIDLNLDISP	JNK/SAPK
	MEK5	LKKSSAELRKIL	ERK5/BMK
MAPKAPK	RSK1	SSILAQRRVRKLPSTTL	ERK/MAPK
	RSK2	RSTLAQRRGIKKITSTAL	
	RSK3	SSNLAQRRGMKRLTSTRL	
	MNK2	QSKLAQRRQRASLSATPV	
	MNK1	KSRLARRRALAQGRSRD	ERK/MAPK, p38
	MSK1	KAPLAKRRKMKKTSTSTE	
	MAPKAPK2	NPLLLKRRKKARALEAAA	p38
	MAPKAPK3	NRLLNKRRKKQAGSSSAS	
	PRAK	NNPILRKRLGTPKPKDS	
	RSKB	NAPLAKRRKQKLSATAS	
PTP	EC-PTP	GLQERRGSNVSLTLDM	ERK/MAPK
	HePTP	RLQERRGSNVALMLDV	
	STEP	GLQERRGSNVSLTLDM	
MKP	CL100/MKP-1	RFSTIVRRRAKGAAGAG	p38, JNK/SAPK (ERK/MAPK)
	MKP-2	RCNTIVRRRAKGSVSLE	
	PAC1	PWNALLRRRARARGPP	
	MKP-3	PGIMLRRLQKGNLPVR	ERK/MAPK
	Pyst2	PGLMLRRLRKGNLPIR	
	MKP-4	LPALLRRLRRGSLSVR	
	B23	LNSVVLRRARGGAVSA	
	hVH5	SKLVKRRLQQGKVTI	p38, JNK/SAPK
	MKP-5	CADKISRRLQQGKITV	

Red ; positively charged amino acids of MAPK docking sites
Green ; I,L,V or M (hydrophobic)

Table 1, MAP kinase と相互作用する分子群とそのMAPK docking siteの配列

A



B

MAP kinase

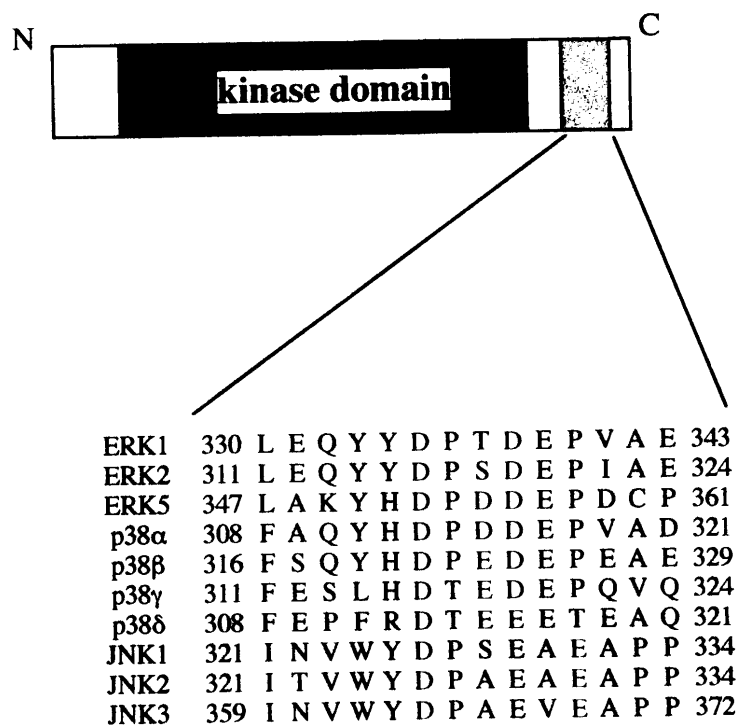
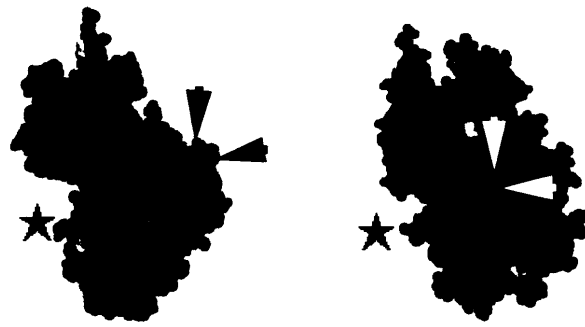


Figure 2 A MAPKK、MKP、MAPKAPKの構造。 **B** MAP kinase上のdocking site。

ERK2



p38



JNK3



Figure 3, ERK2、p38、JNK3の立体構造。左と右は角度を変えて観た図。星印は活性中心。矢印はCD domain 内の分子の表面に露出している負のアミノ酸を示す。

kinase 上の docking site である可能性が高いと考えられる。

MEK1、MKP-3、および MNK1 における ERK docking site の同定および ERK 上のこれら 3 者との docking site の同定。

細胞にタグのついたタンパク質を共発現し、共沈するかどうかで結合能を検討した。MEK1 は ERK 特異的な MAPKK であり、MKP-3 は ERK 特異的な MAPK-phosphatase であり、MNK1 は ERK および p38 に特異的な MAPKAPK である (Kosako et al. 1993; Muda et al. 1996; Fukunaga and Hunter 1997; Waskiewicz et al. 1997)。この三者における MAPK docking site と予想される配列内のリジンもしくはアルギニンをメチオニンに置換したコンストラクトおよび、ERK2 上の docking site と予想される配列内のアスパラギン酸の一つ (D321) をアスパラギンに置換したコンストラクトを作成した (図 4A)。ERK2 の立体構造から、D321 および D324 の側鎖が分子表面に露出しており、D323 は分子の内部に埋まっている (図 3、5)。これらのタンパク質の野生型および変異体の結合能を検討した結果、MEK1、MKP-3、MNK1 の MAPK docking site の変異体は ERK2 との結合がみられず、かつ、ERK2D321N はこの三者との結合能が野生型の ERK2 と比べるとかなり落ちることがわかった (図 4B、C、D)。また、ERK2 の D321 と D324 の両方を N に置換したものは、個々に置換したもの (ERK2D321N および ERK2D324N) に比べて結合能が弱まった (図 4E)。以上の結果から MEK1、MKP-3、MNK1 のリジン、アルギニン残基および ERK2 のアスパラギン酸がそれぞれ結合に必要であることが示された。

MEK1 の N 端 1-32 は野生型 ERK2 には結合するが、ERK2D321,324N には結合しない。

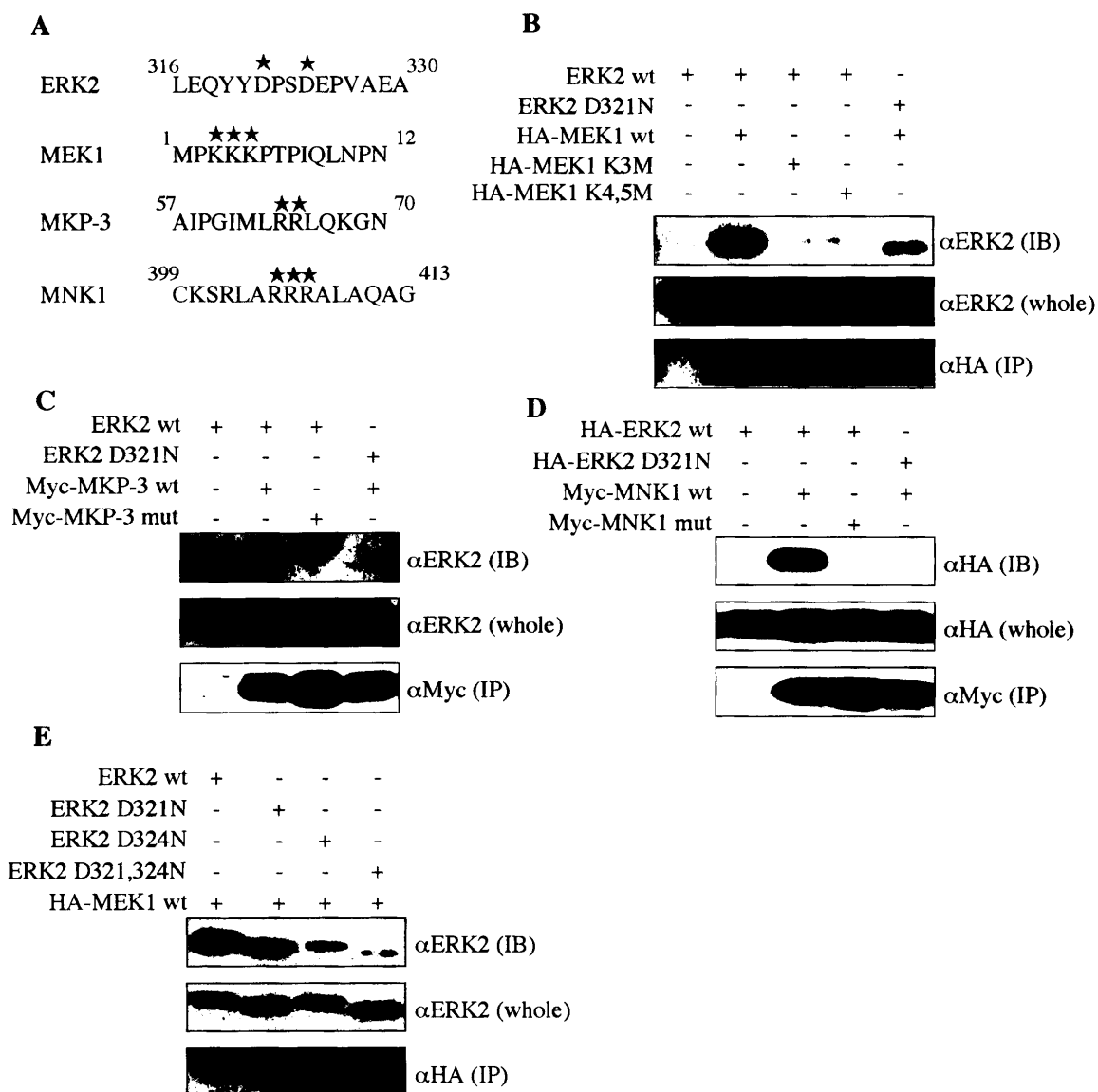


Figure 4, A, ERK2、MEK1、MKP-3、MNK1上の予想されるdocking site。星印は電荷を持ったアミノ酸。変異体では星印のアミノ酸を置換した。D (アスパラギン酸)をN (アスパラギン)に、K (リジン) R (アルギニン)をM (メチオニン)に置換した。**B**, ERK2とMEK1の結合。細胞に共発現し、HA抗体で免疫沈降し、共沈してきたERK2 (αERK2 (IB))、ERK2の発現量(αERK2 (whole))、HA-MEK1の沈降量 (αHA(IP))をαERK2抗体でプロットした。**C**, ERK2とMKP-3の結合をBと同様に検討。**D**, ERK2とMNK1の結合をBと同様に検討。**E**, ERK2のD321N、D324NおよびD321,324NとMEK1の結合をBと同様に検討。

次に、MEK1 の ERK2 結合部位が ERK2 上の MEK1 の結合部位と直接結合するかどうかを検討した。大腸菌で発現し精製した MEK1 の N 端 1-32 アミノ酸の GST 融合タンパク質を用いて、GST-pull down assay を行った。すると、野生型 ERK2 は結合したが、ERK2D321,324N は結合しなかった (図 5B)。このことから、それぞれの結合部位が直接結合することが強く示唆された。また、ERK2 側が負の電荷を持ち、ERK2 と結合する側が正の電荷を持っているので、この電荷を介する静電結合が docking interaction の性質であることが予想される。この予想をつぎに検証した。ERK2 と MEK1 の N 端 1-11 アミノ酸からなるペプチドとの結合を、化学的架橋剤である EDC (1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl] carbodiimide)を用いて検証した。EDC は接触しているアルギニンのアミノ基とアスパラギン酸もしくはグルタミン酸のカルボキシル基を化学的に架橋する性質をもつ。野生型の ERK2 は野生型の MEK1 ペプチドとの架橋が検出されたが、ERK2D321,324N は野生型 MEK1 ペプチドと架橋されず、また、野生型の ERK2 は変異型の MEK1 ペプチドとの架橋が検出されなかった (図 5C)。よって、ERK2 の D321 および D324 と MEK1 の N 端のアルギニンが直接結合することが強く示唆された。架橋されたバンドは野生型の ERK2 よりも低分子量の位置に現れるが (図 5C、星印)、これは、ERK2 D321,324N が野生型の ERK2 よりも低分子量の位置に現れることを考えると自然なことである。さらに、ERK2 と MEK1、MKP-3、MNK1 との結合が MEK1 の N 端ペプチドによって競合的に阻害された (図 5D)。これは ERK2 がこの三者と D321 および D324 を介して結合することを強く支持する。つまり、上記の三者は ERK2 の共通の部位を介して結合する。

ERK2 の D321 と D324 を含む領域は、活性化因子 MEK1、不活性化因子 MKP-3、および基質 MNK1 の三者共通の docking site であることから、CD domain

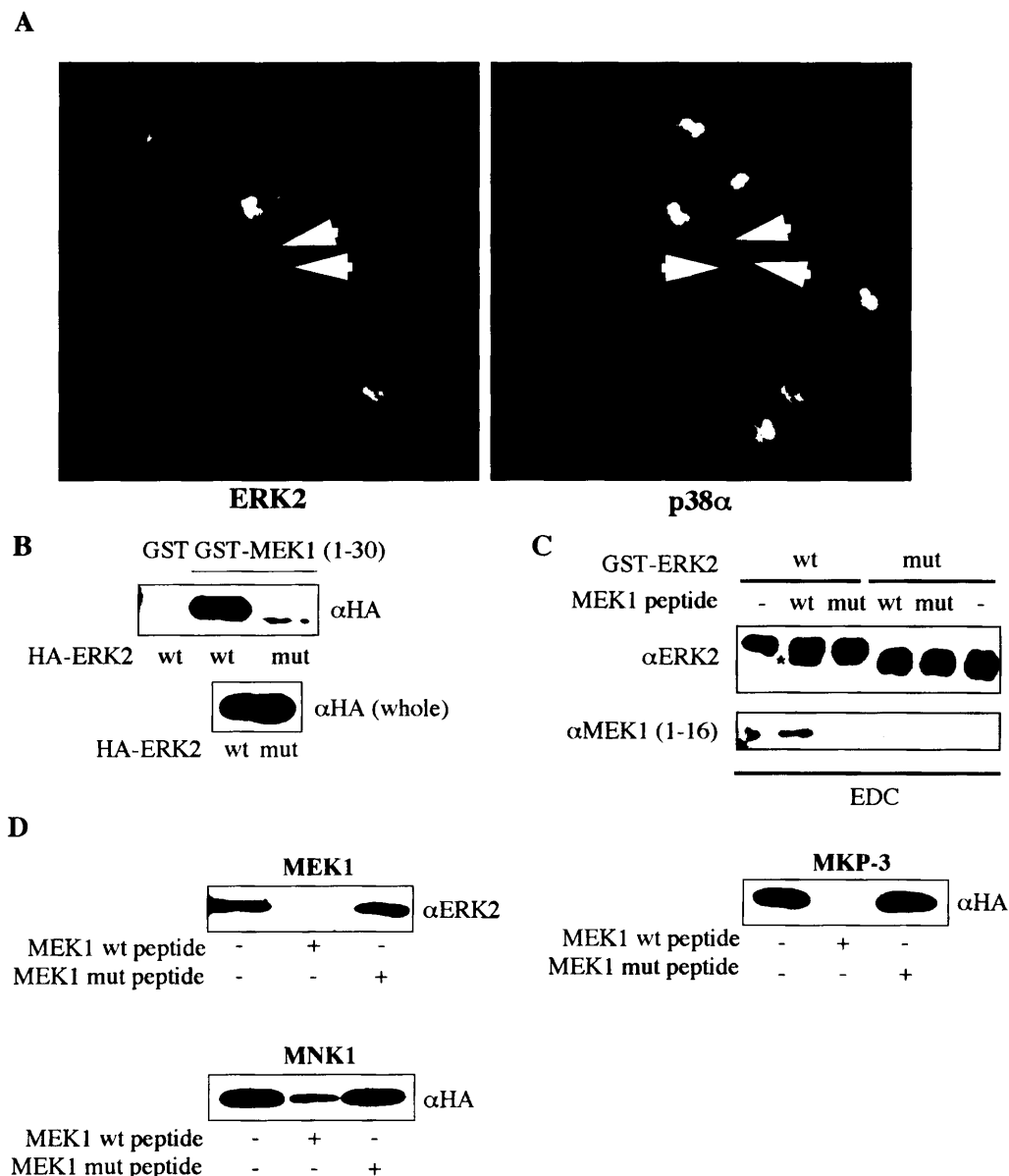


Figure 5, A, ERK2とp38の立体構造。星印は酵素活性の中心、矢印がCD domain内の負の電荷を持つアミノ酸（ERK2においてはD321、D324、p38においてはD313、D315、D316）。**B**, GST-MEK1のN端側1-30アミノ酸によるpull-down assay。ERK2野生型（wt）もしくはERK2D321,324N（mut）を細胞に発現し、GST-MEK1(1-30)でpull-downした。共沈してきたERK2をαHA抗体で検出（上のパネル）。また、ERK2の発現量は同程度である（下のパネル αHA (whole)）。**C**, GST-ERK2とMEK1 peptideのEDCによるクロスリンク。GST-ERK2野生型（wt）もしくはGST-ERK2D321,324N（mut）をMEK1のN端1-15アミノ酸のpeptideとEDCによって架橋した。架橋した産物をαERK2抗体（星印）、もしくはαMEK1抗体（N端の1-16番目までのpeptideを認識する。）によって検出した。**D**, ERK2とMEK1、MKP-3、MNK1との結合のMEK1 peptideによる競合阻害。ERK2とMEK1、MKP-3、MNK1をそれぞれ共発現した。αHA、αMyc抗体で免疫沈降する際にMEK1 peptideの野生型（wt）（MPKKKPTPIQLNPNP）もしくは変異型（mut）（MPKMMPTPIQLNPNP）を混合し、共沈してくるERK2をαHA抗体、もしくはαERK2抗体で検出した。

(Common Docking domain)と名づけた。

CD domain を介する docking interaction は効率の良い酵素反応に必要である。

Docking interaction の、酵素反応の効率における寄与を検討した。細胞に野生型の MEK1 もしくは docking 不能型の MEK1 と ERK2 を共発現し、血清刺激による ERK2 の活性化を検討したところ、Docking 不能型 MEK1 は野生型の MEK1 と比べて、ERK2 を活性化する効率が低いことが示された (図 6A)。また、CD domain の欠損型の ERK2 (ERK2D321,324N) と野生型の ERK2 の GST 融合型タンパク質を大腸菌で発現し、精製して、MEK1 によるリン酸化能を *in vitro* で検討した。活性化した MEK1 は Δ B-Raf:ER 細胞に発現し、エストロゲンで刺激した後に免疫沈降することによって用意した。GST-ERK2D321,324N は野生型に比べて、MEK1 によるリン酸化および活性化の効率が低かった (図 6B)。GST-ERK2 は野生型と変異型とも同程度の basal 活性を持っていることを、自己リン酸化および MBP に対するリン酸化によって確かめた (図 6B)。この結果は、ERK2 の変異体が正常な構造を保っていることを強く示唆すると同時に、artificial な基質に対しては野生型と同程度のリン酸化能を持っていることを示す。同様のことを、MEK1 の活性型、MEK1SDSE を使って検討したところ、やはり、野生型の ERK2 に比べて、CD domain の欠損型の ERK2 (ERK2D321,324N および ERK2Sev (ERK2D324N)) は MEK1 によるリン酸化の程度が低かった (Sevenmaker については考察において述べる) (図 6C)。また、ERK2 の野生型および CD domain の変異型を細胞に発現し、血清刺激による活性化を MBP を基質として計った。すると、野生型の ERK2 に比べて、CD domain の変異型の ERK2 は活性化の程度が低かった (図 6D)。以上のことから、ERK2 と MEK1

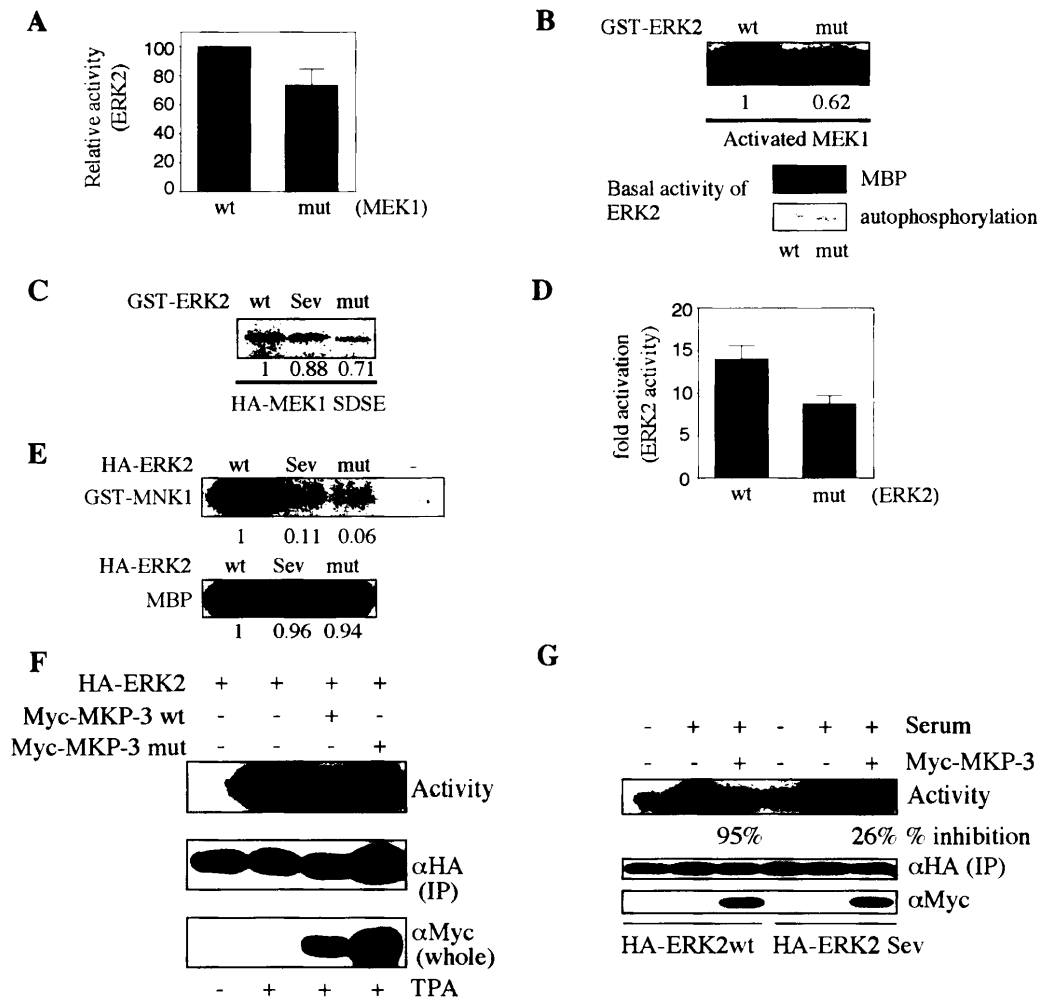


Figure 6, A, MEK1によるERK2の活性化。野生型 (wt) もしくは変異型 (mut) のMEK1とERK2を細胞に共発現し、血清を抜いたあと (12時間)、血清刺激を加え (15分)、ERK2の活性をキナーゼアッセイ法で検討した。3回の独立した実験結果をグラフに表した。**B**, GST-ERK2の、in vitroでのMEK1によるリン酸化。活性化したMEK1はΔB-Raf:ER細胞に発現し、エストロゲンで刺激した後に免疫沈降することによって用意した。GST-ERK2野生型 (wt)、GST-ERK2D321,324N (mut) に関して、MBPを基質として検討した。また、GST-ERK2のMBPに対するbasal活性 (MBP) および自己リン酸化活性 (autophosphorylation) を計った (Basal activity of ERK2)。**C**, Bと同様のことを活性化型MEK1 (MEK1SDSE) を使用して検討した。GST-ERK2野生型 (wt)、D321,324N (mut)、Sev (D324N) に関して検討した。**D**, ERK2の野生型 (wt) もしくは変異型 (D321,324N) を細胞に発現し、血清を抜いたあと (12時間)、血清刺激を加え (15分)、ERK2の活性をキナーゼアッセイ法で検討した。3回の独立した実験結果をグラフに表した。**E**, GST-MNK1のERK2によるリン酸化。活性化したHA-ERK2をΔB-Raf:ER細胞に発現し、エストロゲンで刺激した後に免疫沈降することによって用意した。GST-MNK1に対するリン酸化能をin vitroでキナーゼアッセイ法により検討した。ERK2野生型 (wt)、D321,324N (mut)、Sev (D324N) に関して検討した。GST-MNK1は細胞に発現してGSHピーズにより回収した。**F**, MKP-3によるERK2の不活性化。細胞にHA-ERK2およびMyc-MKP-3を共発現し、血清を抜いたあと (12時間)、TPAを加え (15分)、ERK2の活性をMBPを基質とするキナーゼアッセイ法で検討した (Activity)。MKP-3の野生型 (wt) および変異型 (mut) に関して検討した。HA-ERK2の発現量 (αHA(IP))、およびMKP-3の発現量 (αMyc(whole)) を確認した。**G**, MKP-3によるERK2変異体の不活性化。Fと同様にERK2の活性をMBPを基質とするキナーゼアッセイ法で検討した (Activity)。ERK2の野生型 (wt) と変異型 (Sev(D324N)) に関して検討した。

において、CD domain を介する docking interaction が効率の良い酵素反応に必要であることが示された。次に、ERK2 による MNK1 のリン酸化能を検討した。ERK2 をΔB-Raf:ER 細胞に発現し、エストロゲンで刺激することによって活性化し、免疫沈降し、GST-MNK1 に対するリン酸化能を検討した。CD domain の欠損型の ERK2 (ERK2D321,324N および ERK2Sev (D324N)) は野生型の ERK2 に比べて、MNK1 に対するリン酸化能が低いことが確かめられた(図 6E)。MKP-3 に関しても、docking 不能型 MKP-3 は ERK2 を不活性化する能力が低く、CD domain の欠損型の ERK2 は野生型の ERK2 に比べて MKP-3 による不活性化の効率が低かった(図 6F, G)。以上、ERK2 に関して、CD domain を介する docking interaction が効率の良い酵素反応に必要であることが確かめられた。

p38 および JNK/SAPK においても CD domain は保存されている。

次に、CD domain が p38 および JNK/SAPK においても ERK2 の場合と同様に活性化因子、不活性化因子、基質との docking site として機能するのか検討した。p38 の CD domain には 4 つのグルタミン酸が存在するが、そのうちの 3 つが分子の表面に露出している(図 3、5、7A)。始めの 2 つをグルタミンに置換したコンストラクトを p38mut1 と呼び、3 つをすべてグルタミンに置換したものを p38mut2 と呼ぶ。p38 および JNK/SAPK 特異的な dual specificity phosphatase である MKP-5 との結合を検討したところ、p38mut1、mut2 とともに野生型の p38 に比べて結合能が落ちていた。p38mut2 の方が p38mut1 よりも結合能が弱まっていた(図 7C)。これは、マイナスの電荷の数によって結合能が決定されていることを強く示唆する。さらに、MKP-5 の p38 docking site のアルギニンをすべてメチオニンに置換した変異体は p38 との結合が見られなかった(図 7C)。さらに p38 特異的な MAPKK である MKK6 との結合を検討した(Moriguchi et al.

1996)。GST 融合タンパク質による pull-down assay の系を使った。野生型の MKK6 は GST-p38 と結合したが、p38 docking site と予想される配列のアルギニンをメチオニンに置換した変異型 MKK6 (MKK6mut) は結合が見られなかった (図 8B)。また、p38 の野生型は GST-MKK6 と結合がみられたが、p38 の CD domain の変異体 (p38mut2) は結合しなかった (図 7B)。さらに、ERK と p38 特異的な MAPKAPK である MNK1 との結合を検討した。p38 の野生型と MNK1 は結合するが、p38 の CD domain の変異体 (p38mut2) は結合しなかった (図 7D)。MNK1 の MAPK docking site の変異体 (MNK1mut) は p38 と結合しなかった (図 7D)。つぎに、JNK2 と JNK/SAPK に特異的な MAPKK である SEK1/MKK4 との結合を GST 融合タンパク質による pull-down assay の系によって観察した。JNK2 の野生型は GST-SEK1 と結合したが、JNK2 の CD domain の変異体 (JNK2mut) は結合が弱まった (図 7E)。また、MKP-5 との結合も同様にしらべたところ、JNK2 の野生型は MKP-5 と結合したが、CD domain の変異体 (JNK2mut) は結合が弱まった (図 7E)。さらに、細胞に共発現し共沈の系であるが、MKP-5 の MAPK docking site の変異体 (MKP-5mut) は JNK2 との結合が野生型の MKP-5 に比べて弱まった (図 7F)。以上の結果から、CD domain は p38 および JNK においても ERK2 と同様に、docking site として機能していることが示された。

次に、p38 と MKP-5 において、docking interaction が酵素反応に必要であるかどうか検討した。野生型の p38 は野生型の MKP-5 によって効率良く不活性化されるが、CD domain の変異体 (p38mut2) は野生型の MKP-5 による不活性化の効率が野生型同士に比べると下がり、また、MKP-5 の MAPK docking site の変異体 (MKP-5mut) は野生型よりも p38 を不活性化する効率が下がった (図 8A)。さらに、MAPK docking site の変異体の MNK1 は、p38 を活性化する刺激である浸透圧刺激による活性化が野生型よりも低かった (図 8B)。以上の結果から、CD domain を介する docking interaction が、ERK2 の場合と同様に、p38 pathway

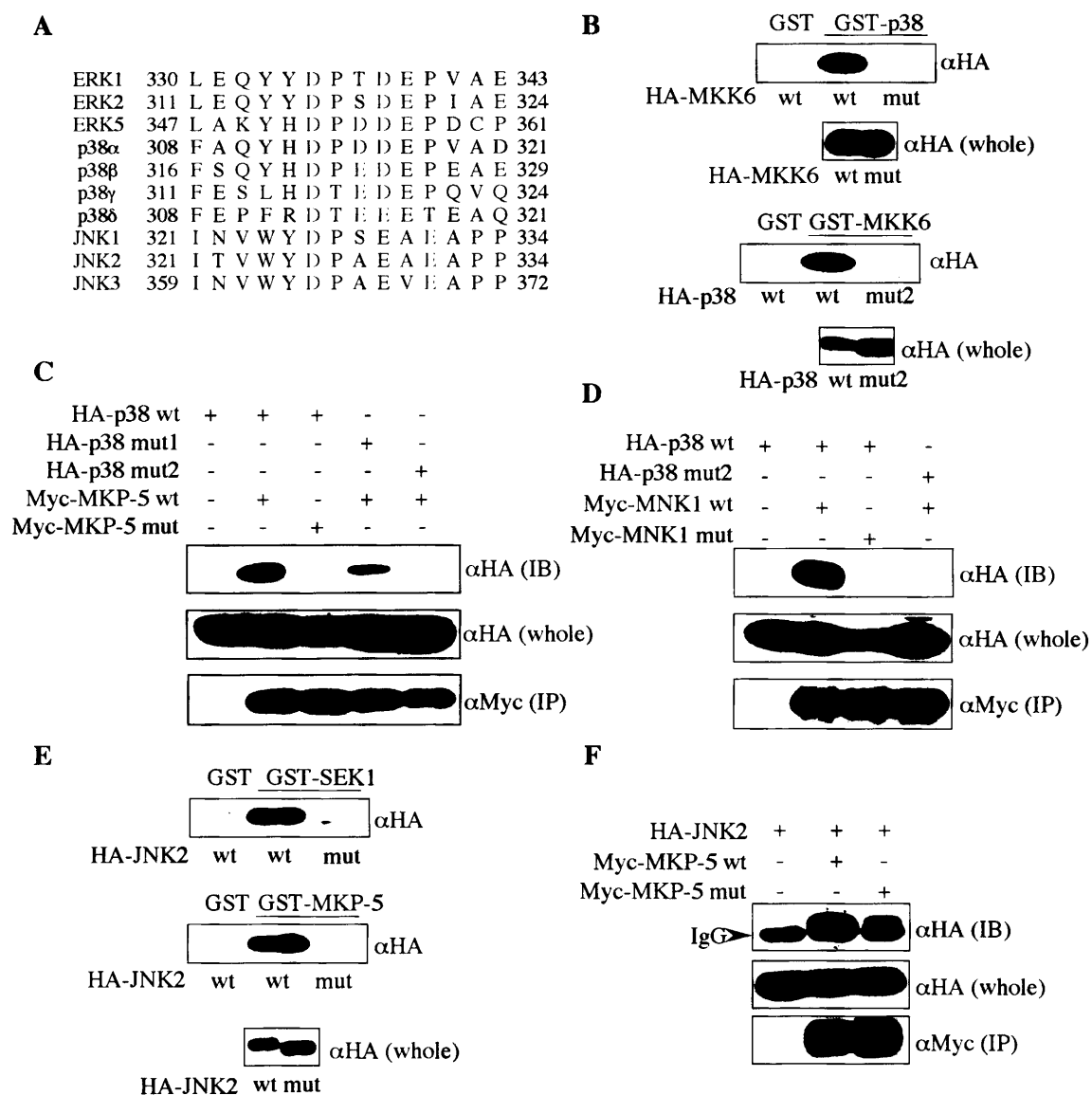
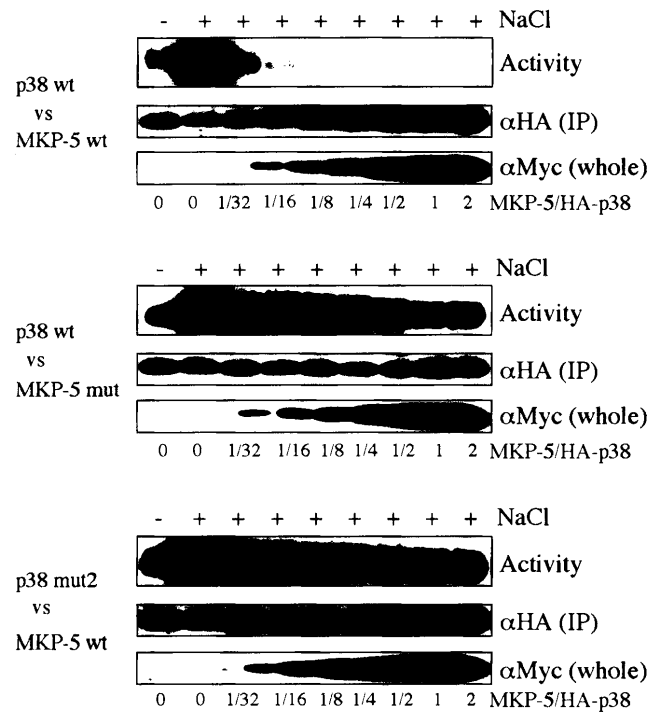


Figure 7, A, MAP kinase ファミリーのCD domainの比較。分子の表面に露出していると考えられる負の電荷を持つアミノ酸を赤色で示した。**B**, MKK6とp38の結合。GST-p38により、細胞に発現したHA-MKK6をpull-downした。HA-MKK6野生型 (wt) および変異型 (mut) に関して検討した (上の2つのパネル)。GST-MKK6により、細胞に発現したHA-p38をpull-downした。HA-p38野生型 (wt) および変異型 (mut) に関して検討した (下の2つのパネル)。**C**, p38とMKP-5の結合。p38の野生型 (wt) および変異型 (mut1もしくはmut2) とMKP-5の野生型 (wt) および変異型 (mut) の結合をFigure 1 Bと同様に検討した。**D**, p38とMNK1の結合に関して、Cと同様に検討した。**E**, SEK1/MKK4もしくはMKP-5とJNK2の結合をGST-pull downの系を用いて検討した。JNK2の野生型 (wt) もしくは変異型 (mut) を細胞に発現し、GST-SEK1もしくはGST-MKP-5によってpull-downした。**F**, JNK2とMKP-5の変異型の結合をCと同様に検討した。

A



B

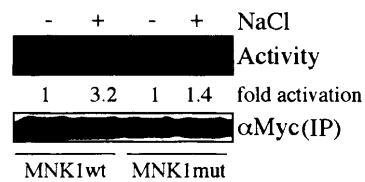


Figure 8, A, MKP-5によるp38の不活性化。細胞にp38とMKP-5を共発現し、浸透圧刺激によるp38の活性化をHis-ATF2を基質として検討した (Activity)。MKP-5とp38の、細胞にtransfectionするDNAの量の比を、p38を一定にしてふった (MKP-5/HA-p38)。p38の免疫沈降量 (αHA(IP)) およびMKP-5の発現量 (αMyc(whole)) を検討した。p38の野生型とMKP-5の野生型 (上)、p38の野生型とMKP-5の変異型 (中)、p38の変異型 (mut2) とMKP-5の野生型 (下) の組み合わせに関して検討した。**B**, 細胞にMNK1の野生型もしくは変異型を発現し、浸透圧刺激 (0.5M NaCl) を加えて、MNK1の活性を、MBPを基質として計った (Activity)。野生型および変異型ともに同程度の発現量であった (αMyc(IP))。

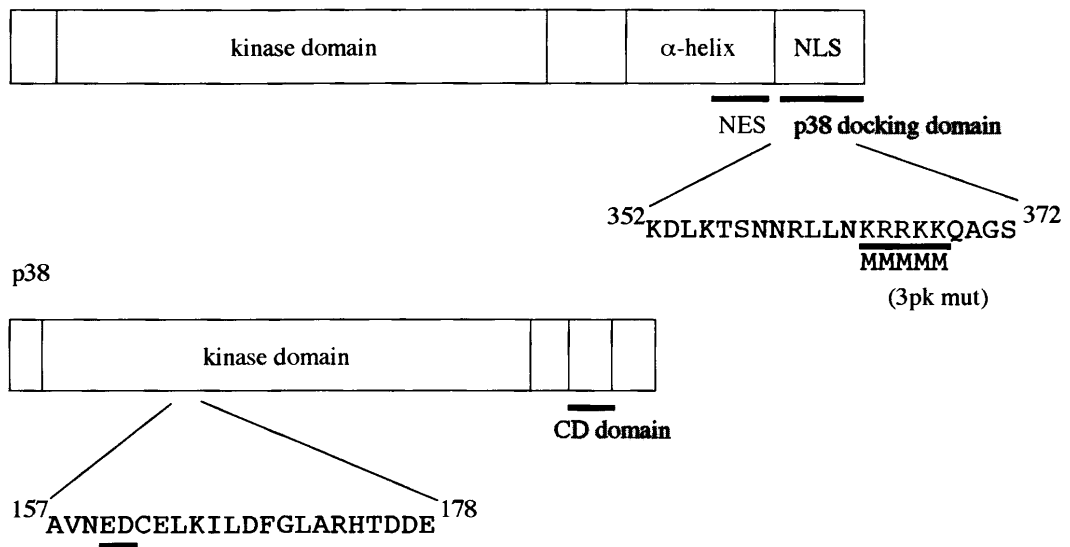
においても効率の良い酵素反応には必要であることが示された。

p38 と MAPKAPK-3/3pk の docking interaction。

次に、CD domain を介する docking interaction がその他の MAPKAPK においても共通の機構であるのかを確かめるために、まず、p38 に特異的な MAPKAPK である MAPKAPK-3/3pk との結合を検討した。MAPKAPK-3 には C 端の MAPK docking site と予想される部位に 5 つのアルギニン残基が存在する。この 5 つをすべてメチオニンに置換したコンストラクトを作製し (図 9A)、p38 との結合を、共発現、共沈の系で調べたところ、野生型同士は結合するが、変異体の 3pk は結合がみられなかった (図 10A)。この結果から、MNK1 の場合と同様に 3pk においても C 端のアルギニンのクラスターが MAPK docking site として機能することが確かめられた。また、p38 の CD domain の変異体 (p38CDm) と 3pk の結合を検討したところ、MNK1 の場合は結合がほとんど観察されなかった (図 7D) のに対して、3pk の場合は野生型に比べて結合は弱まるものの、かなりの割合の p38 が結合した (図 10A)。この結果から、3pk と p38 との結合には CD domain 以外の部分も結合に重要な役割を果たしていることが示唆される。我々は、CD domain 以外の結合部位を同定することを目的として、p38 の立体構造を検討してみた。CD domain から少し離れた位置にもう一つの負のアミノ酸のクラスターの存在に気がついた (図 9A,B)。このアスパラギン酸とグルタミン酸が p38 と 3pk との docking interaction に関与しているのかを検討するために、この 2 つのアミノ酸をスレオニンに置換した変異体 p38(p38ETDT)、CD domain の変異体 (p38CDm) および両方を置換した変異体 p38 (p38all) を作製した (図 9A)。3pk との結合を検討した結果、p38ETDT、p38CDm の順に結合能が弱まり、CD domain と ED site の両方の変異体 (p38all) は結合が完全に失われた (図

A

MAPKAPK-3 (3pk)



B

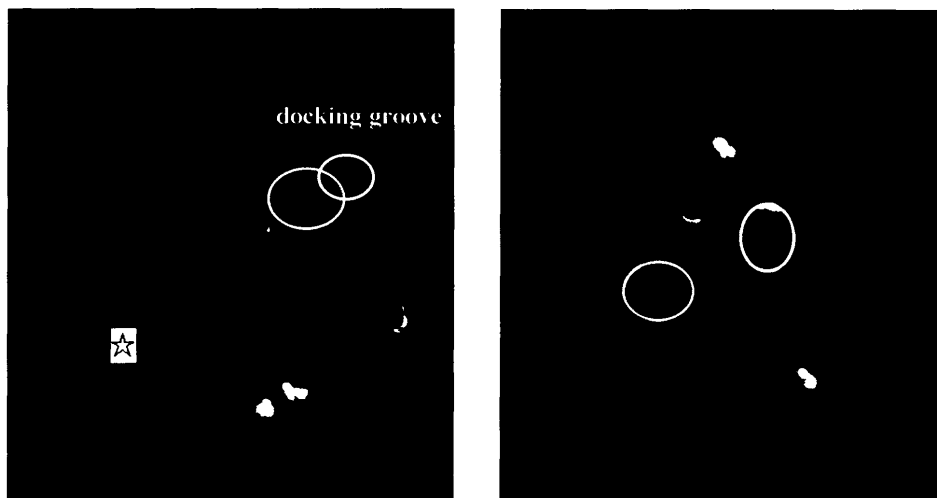


Figure 9, A MAPKAPK-3/3pkとp38の構造。 **B** p38の立体構造。黄色の円がCD domain、白の円がED site。

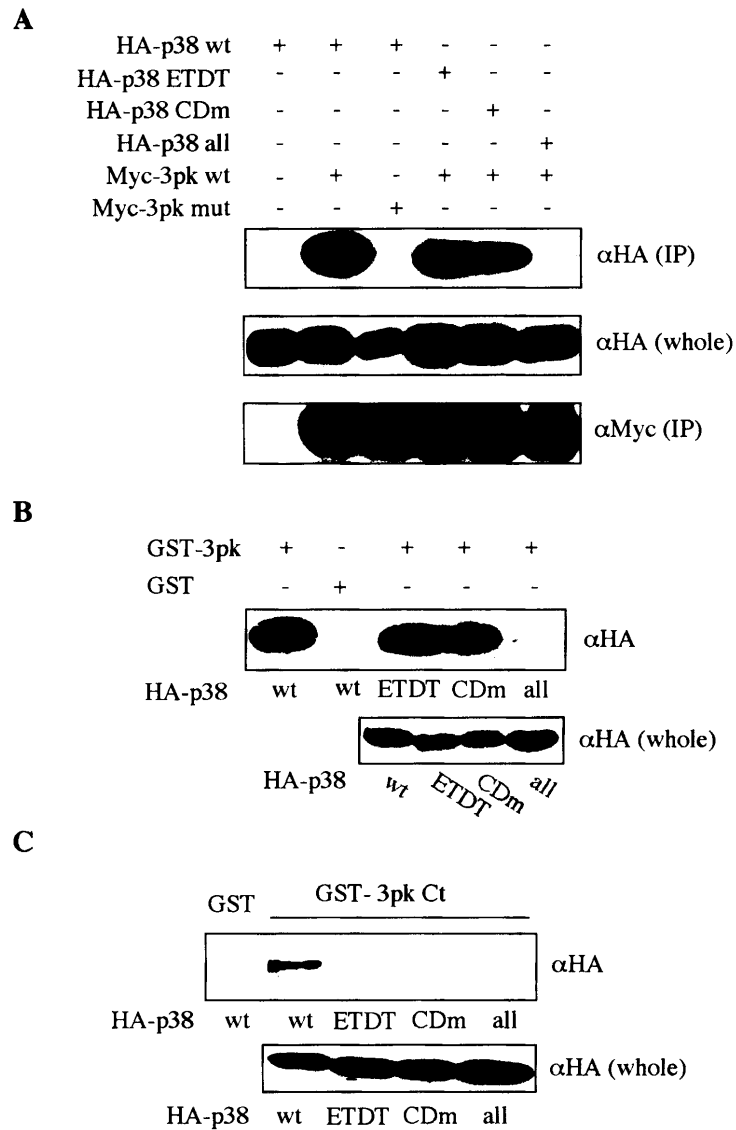


Figure 10 A, p38とMAPKAPK-3/3pkの結合。p38wt、ETDT、CDm、allと3pkのwtもしくはmutとの結合を共発現、共沈の系で検討した。**B**, GST-3pkによるp38のpull-down。HA-p38wt、ETDT、CDm、allをそれぞれ細胞に発現し、そのlysateを使ってGST-3pkによるpull-down assayを行った。結合したHA-p38をαHAでdetectした(αHA)。p38の発現量は一定である(αHA (whole))。**C**, GST-3pkCtによるp38のpull-down。p38wt、ETDT、CDm、allを細胞に発現し、Bと同様に検討した。

10A)。さらに、GST-pull down の系においても、p38wt、p38ETDT、p38CDm、p38all の順に結合が弱まった (図 10B)。以上の結果から、CD domain と ED site の両方が p38 と 3pk の docking interaction には必要であることが考えられる。CD domain および ED site と 3pk 上の p38 docking site との直接の結合を検討するために 3pk の C 端と GST の融合タンパク質 (GST-3pkCt) を大腸菌で発現し、精製した。この GST-3pkCt と野生型 p38 は結合したが、p38ETDT、p38CDm、p38all とは結合しなかった (図 10D)。この結果から、3pk の C 端の p38 docking site と CD domain、ED site との直接の結合が強く示唆された。

Docking interaction は p38 と 3pk においても効率の良い酵素反応に必要である。

p38 と 3pk においても CD domain と ED site を介する docking interaction が効率の良い酵素反応に必要であるかどうか検討を加えた。3pk の野生型と 3pk の docking deficient 変異体を細胞に発現し、p38 の活性化刺激である浸透圧刺激を加えると、野生型 3pk は効率良く活性化されるが、docking deficient 3pk は活性を計ることができなかった (図 11A)。また、in vitro において野生型 3pk は活性化した p38 によって効率良くリン酸化されるが、docking deficient 3pk はリン酸化の効率が低かった (図 11B)。さらに、p38 の野生型、p38ETDT、p38CDm、p38all を細胞に発現し、免疫沈降で回収し、in vitro で MKK6 によって活性化した後、GST-3pk に対するリン酸化能を検討したところ、野生型、p38ETDT、p38CDm、p38all の順に 3pk をリン酸化する能力がさがっていることが明らかとなった (図 11C,D)。このとき、p38 の、artificial な基質である MBP に対するリン酸化能はすべての変異体および野生型において同程度であることが確かめられた (図 11C)。よって、これらのアミノ酸置換は p38 のキナーゼ活性を失わせ

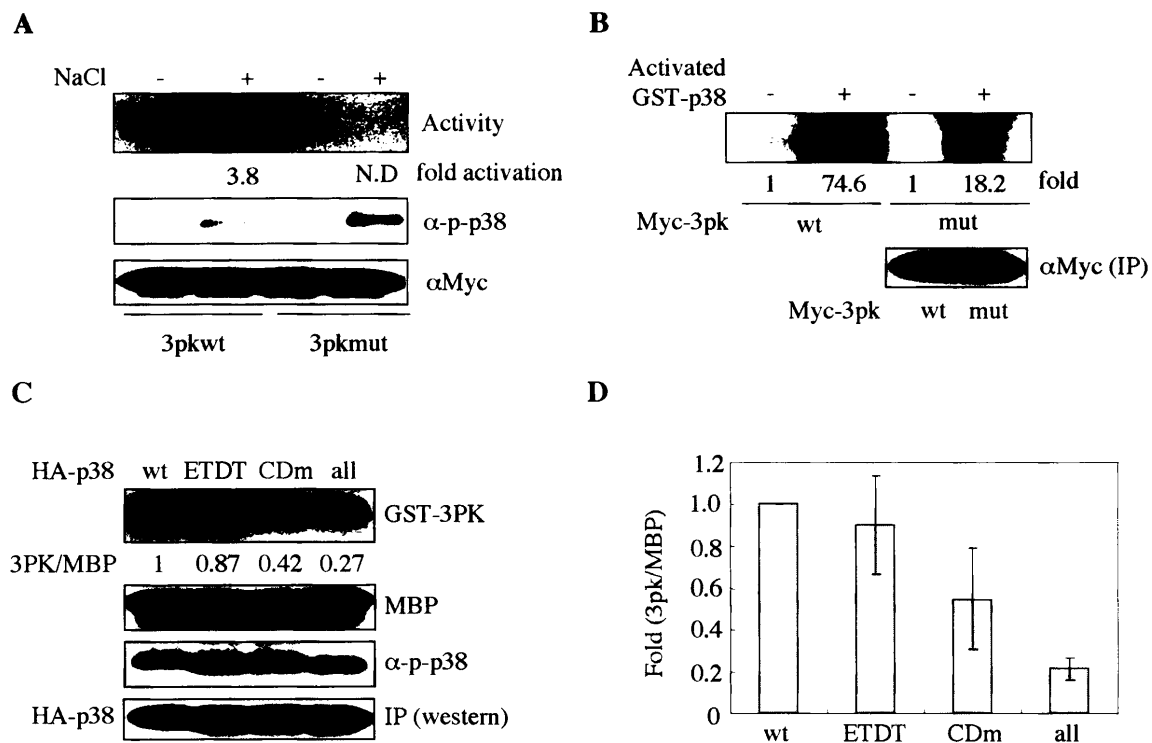


Figure 11 **A**, 細胞に3pkのwtとmutを発現し、浸透圧刺激による活性化をMBPを基質として検討した (Activity)。細胞内のendogenousなp38の活性化を抗活性化p38抗体を用いて確認した (α -p-p38)。Myc-3pk wtとmutの発現量は同程度である (α Myc)。 **B**, p38による3pkのin vitroでのリン酸化。3pkの野生型およびmutを細胞に発現し、回収した (α Myc (IP))。GST-p38をHis-MKK6によりin vitroで活性化し、用意した。活性化したGST-p38による3pkのリン酸化能を検討した (上のパネル)。 **C**, p38の変異体による3pkのin vitroでのリン酸化。同じ量のp38を細胞に発現し、免疫沈降により回収した (IP(western)) 後、in vitroでHis-MKK6により活性化した。p38のリン酸化は同程度であり (α -p-p38)、MBPにたいするリン酸化能も同程度であった (MBP)。これらのp38によるGST-3pkに対するリン酸化能を検討した (GST-3pk)。 **D**, Cの定量。wtのリン酸化の値を1とした。4回行った実験結果の定量である。

るものではない。以上の結果から、3pk と p38 においても、docking interaction は効率の良い酵素反応に必要であることが明かとなった。

Docking interaction は 3pk の細胞局在を規定する。

MAPKAPK-3 と非常に相同性の高い MAPKAPK である MAPKAPK-2 の C 端の配列が NLS (nuclear localization signal) として機能するという報告がなされており、この部分は MAPK docking site であると予想される配列と重なっている。MAPKAPK-2 の C 端には NES 配列 (nuclear export signal) が存在し (NLS 配列よりも N 端側)、さらに p38 によるリン酸化部位も存在する。MAPKAPK-2 は刺激が入ると p38 によってリン酸化され、その結果、NES が露出し、核から出て細胞質に局在する (Engel et al. 1998; Ben-Levy et al. 1998)。MAPKAPK-3/3pk においても NES 様配列、リン酸化部位、NLS 様配列が保存されているので、MAPKAPK-3/3pk の C 端のアルギニンのクラスターは MAPK docking site の機能と NLS としての機能を併せ持つと考えられる。この予想を検討した。GFP タグのついた MAPKAPK-3/3pk は細胞に発現すると核内に局在するが、MAPK docking site の変異体は細胞質と核の両方に局在する (図 12B)。よって、MAPK docking site のアルギニンのクラスターは NLS としての役割も果たしていることが強く示唆される。また、3pk の C 端の配列を GFP に繋いだタンパク質 (GFP-3pkCt) を細胞に発現すると細胞質に局在し、LMB (Leptomycin B (NES 依存的な核外移行の阻害剤)を加えることによって核内に移行することから、3pk の C 端にも NES が存在し、さらに、浸透圧刺激によって全長の 3pk は核外へと移行することから、MAPKAPK-2 と同様に、3pk においても p38 によるリン酸化によって NES が露出するという機構が保存されているものと考えられる

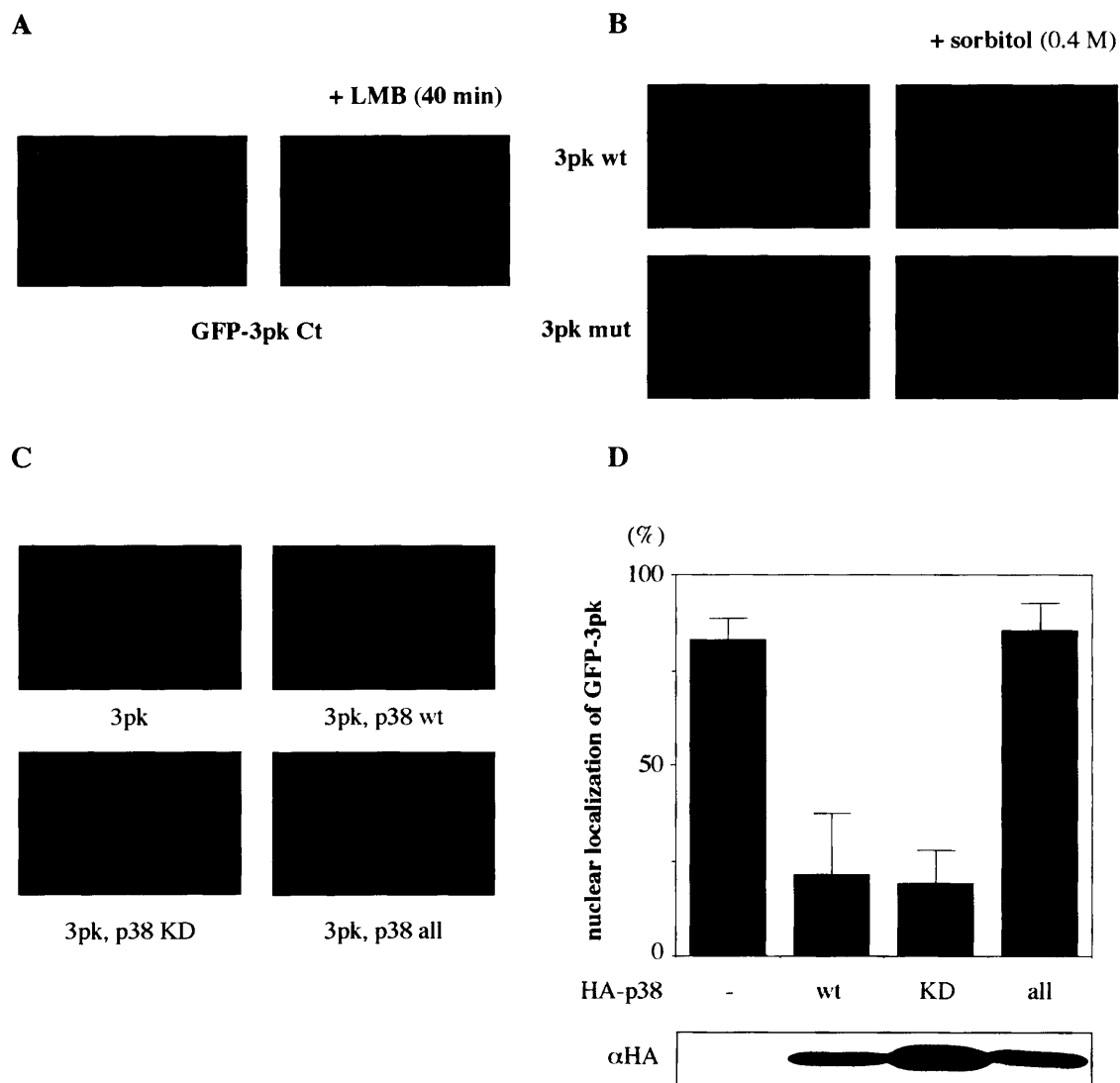


Figure 12, A, GFP-3pkCtを細胞に発現し、局在を観察した。LMB (8 ng/ml)を加える前 (左) と後 (右) の細胞。 **B**, GFP-3pkの浸透圧刺激前後の局在。GFP-3pkwt (上の2つのパネル) とGFP-3pkmut (docking deficient)の局在をsorbitol (0.4M 45min)刺激の前 (左) と後 (右) で観察した。 **C**, GFP-3pkとp38を共発現してGFP-3pkの局在を観察した。p38wt、p38KD (kinase dead)、p38 allと共発現して検討した。 **D**, Cの定量。GFP-3pkが核内に局在している細胞の、GFP陽性細胞中における割合 (%)を示す。3回の独立した実験結果の定量である。HA-p38の発現量は同程度である (α HA)。

(図 12A,B)。野生型の 3pk は浸透圧刺激依存的に核外に移行するのに対して、docking deficient 3pk は核からの移行がみられず、刺激前後で細胞内局在に変化がなかった (図 12B)。この結果は docking deficient 3pk は p38 によるリン酸化の効率が下がるという in vitro での結果をさらに補強するものである。また、MAPK docking site と NLS が重なっているということから、p38 と NLS に作用する importin とが競合することが予想される。p38 と GFP-3pk を細胞に共発現し、3pk の局在を観察した。p38 の野生型を発現すると核と細胞質の両方に局在するのに対して、p38 の docking deficient 変異体 (p38CDm) と共発現しても、3pk 単独の場合と同様、細胞質にはみられず核に局在した。また、p38 の kinase 不能型 (p38KD (K53M)) を発現しても野生型と同様に、3pk の局在は細胞質と核の両方にみられた。よって p38 のキナーゼ活性は必要ないことがわかった。以上の結果から、p38 の結合によって 3pk の NLS がマスクされ、局在が規定されることが示された。

ED site は p38 と ERK2 の 3pk に対する docking interaction の特異性を規定する。

p38 の ED site に対応するアミノ酸は ERK2 においては 2 つのスレオニンである (TT site)。この 2 つのスレオニンは一次配列上、p38 の ED site と同一の部分にあり、かつ三次元立体構造上も同一の位置に存在し、その側鎖は分子の表面に露出している (図 13A,B)。我々はこのスレオニンとグルタミン酸およびアスパラギン酸の違いと CD domain 内の負の電荷を持つアミノ酸の数の違いが ERK2 と p38 の docking interaction の特異性を規定しているのではないかと予想をたて、検証した。ERK2 の CD domain 内のセリンをアスパラギン酸に置換し、かつ ED site に対応する 2 つのスレオニン (TT site) をアスパラギン酸およびグ

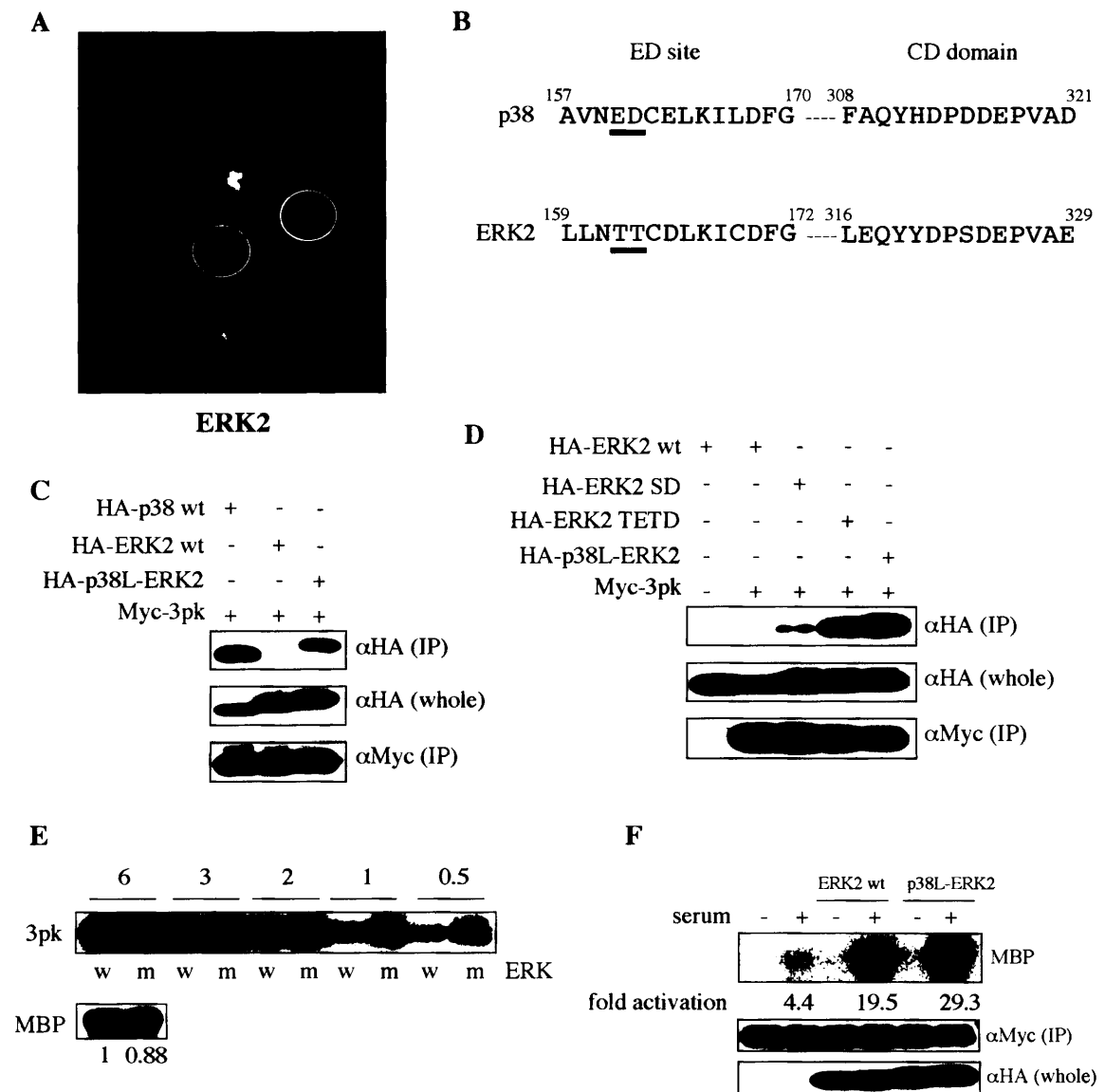


Figure 13, A, ERK2の立体構造。黄色がCD domain、白色がED (TT) siteである。**B**, p38とERK2のED siteとCD domainのアミノ酸配列の比較。**C**, ERK2およびp38と3pkの結合。p38wt、ERK2wt、p38like-ERK2に関して検討した。**D**, ERK2の変異体と3pkの結合。HA-ERK2wt、SD、TETD、p38like-ERK2と3pkの結合を検討した。**E**, ERK2wtとp38like-ERK2による3pkのin vitroでのリン酸化。ERK2wt (wt)とp38like-ERK2 (mut)をΔB-Raf:ER細胞に発現し、エストロゲンで刺激することによって活性化し、免疫沈降によって回収した。いずれもMBPに対しては同程度のリン酸化能を持つ (MBP)。GST-3pkをprecision proteaseによってGSTを取り除いた後に基質として使用した。同じ量のERK2を使用した。20 μlの系に6、3、2、1、0.5 μgの3pkを入れた。**F**, 共発現の系による、3pkの活性化。細胞にERK2、ERKlike-p38を3pkと共発現し、血清を抜いたあと (12時間)、TPAを加え (15分)、3pkの活性をMBPを基質とするキナーゼアッセイ法で検討した (MBP)。同程度のMyc-3pk (αMyc (IP))およびHA-ERK2 (αHA (whole))が発現していることを確かめた。

ルタミン酸に置換した変異体を作成した。これを p38like-ERK2 (p38L-ERK2)と呼ぶ。また、CD domain のみの変異体を作製し、ERK2SD と呼び、スレオニンのみの変異体を ERK2TETD と呼び、p38 の野生型は 3pk と結合したが、ERK2 の野生型は結合が見られなかった。しかし、p38like-ERK2 は 3pk と結合することが示された (図 13C)。次に、ERK2SD、ERK2TETD、p38like-ERK2 の 3pk に対する結合能を比べたところ、p38like-ERK2、ERK2TETD、ERK2SD の順で結合が強まった (図 13D)。よって、ED (TT) site の方が docking interaction の特異性を規定していると考えられる。次に、docking が強くなったことが酵素反応にどのような影響をおよぼすか検討した。活性化した ERK2 の野生型および p38like-ERK2 をΔB-Raf:ER 細胞に発現し、エストロゲンで刺激した後に免疫沈降することによって用意した。MBP に対するリン酸化能は両者とも同程度であったが、3pk に対しては、p38like-ERK2 の方が野生型よりも強いリン酸化能を示した (図 13E)。また、細胞に 3pk と ERK2 を共発現し、血清刺激による 3pk の活性化を検討したところ、p38like-ERK2 と共発現した方が野生型と共発現した場合よりもより強く活性化された (図 13F)。以上の結果から、ERK2 の TT site を p38 様に置換すると docking interaction の特異性が変わり、かつ酵素反応の特異性も p38 様に变化したと考えられる。

その他の MAPKAPK との docking interaction。

次に、その他の MAPKAPK の docking interaction における、CD domain と ED site の寄与について検討を加えた。p38 特異的な MAPKAPK である MSK2 (Deak et al. 1998; Pierrat et al. 1999) との結合を共発現、共沈の系を用いて検討した。p38 の野生型および p38ETDT は MSK2 と結合したが、p38Cdm は結合しなかった (図 15A)。よって、p38 と MSK2 の結合には CD domain が必要であり、ED site の

寄与は少ないことが強く示唆される。さらに、ERK2 との結合に関して検討を加えた。野生型の ERK2 は MSK2 と結合しなかったが、p38like-ERK2 は結合がみられた (図 15B)。さらに CD domain と ED site のいずれが特異性の決定に関与しているのか検討した。ERK2SD および ERK2TETD のいずれも野生型の比べると結合はみられたが、p38like-ERK2 よりも結合能は低かった (図 15C)。よって、CD domain と ED site の両方が特異性の決定に関与していることが明らかとなった。つぎに、p38 特異的な MAPKAPK である PRAK に関して検討した (New et al. 1998)。p38 の野生型は PRAK と結合したが、ERKlike-p38 および ERK2 の野生型は結合がみられず、また、p38like-ERK2 は野生型 ERK2 と比べると結合能が増加した (図 15D)。さらに ERK2 と p38 の両方に特異的な MAPKAPK である MSK1 に関して結合を検討した (Deak et al. 1998; New et al. 1999)。野生型の p38 は MSK1 と結合し、p38ETDT はその結合がさらに強まり、p38 の CDm は結合がみられなかった (図 16A)。また、ERKlike-p38 は野生型と比べて結合が強く、また、p38like-ERK2 も野生型と比べると結合が強まった (図 16B)。ERK2 においても CD domain は MSK1 との結合に必要である。以上の結果から、CD domain は p38 と ERK2 のいずれにおいても MSK1 との結合に必要であるが、ED site は結合には関与するものの、それぞれで異なる使われ方をしていると考えられる。次に、ERK に特異的な MAPKAPK である RSK2 に関して結合を検討した。野生型の ERK2 は野生型の RSK2 と結合するが、野生型の p38 および ERK-likep38 は結合しなかった (図 17A)。p38like-ERK2 は野生型と比べると結合が弱まったが、結合が完全になくなるわけではない。よって、RSK2 と MAP kinase の docking interaction の特異性を規定しているのは CD domain と ED site の負の電荷を持つアミノ酸以外のアミノ酸であると考えられる。ERK2 の CD domain の変異体は RSK2 との結合がみられなかったので、CD domain が結合に重要であることは確かめられた (図 17B)。次に、ERK と p38

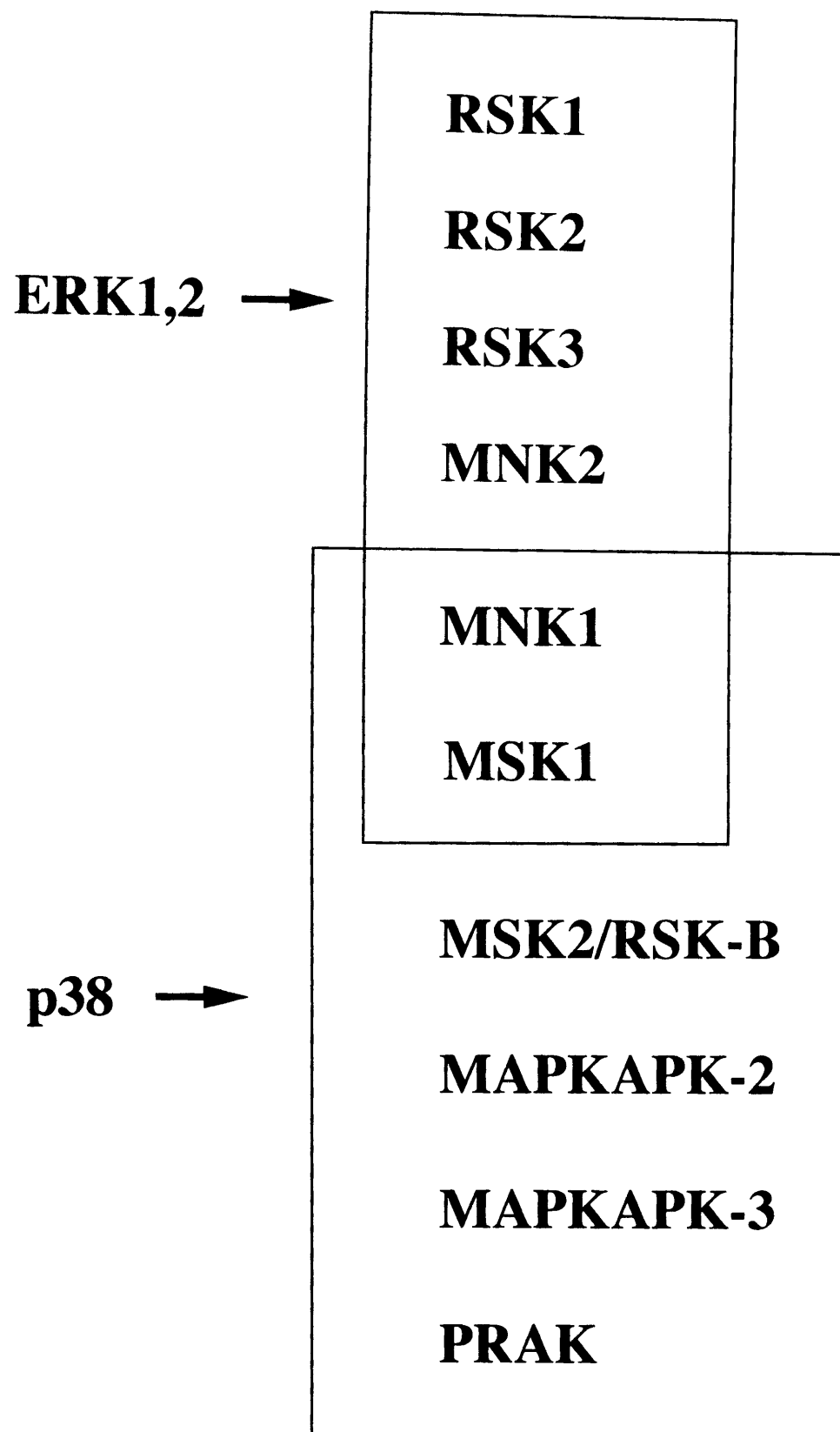


Figure 14,報告されているMAPKAPK。ERKによって活性化されるものを赤色で、p38によって活性化されるものを青色で示している。両方に活性化されるものは紫色。

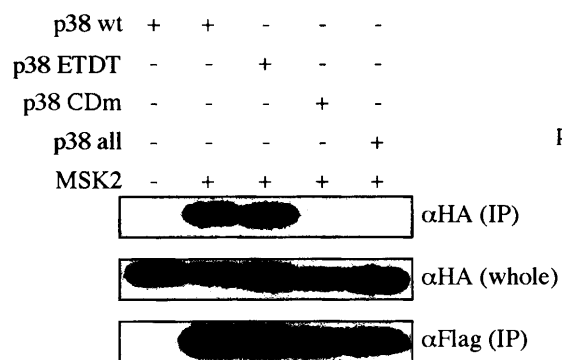
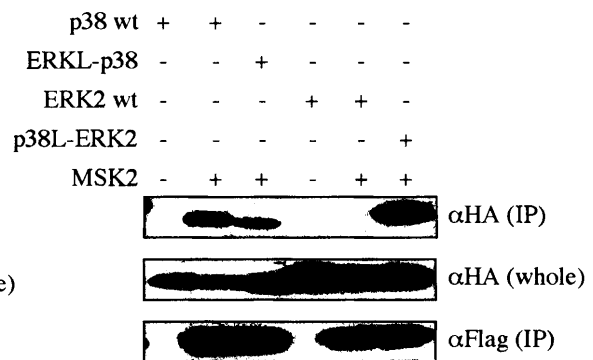
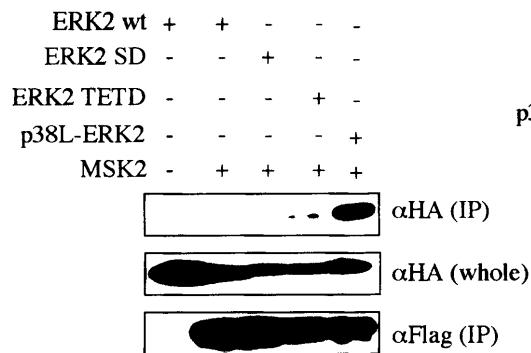
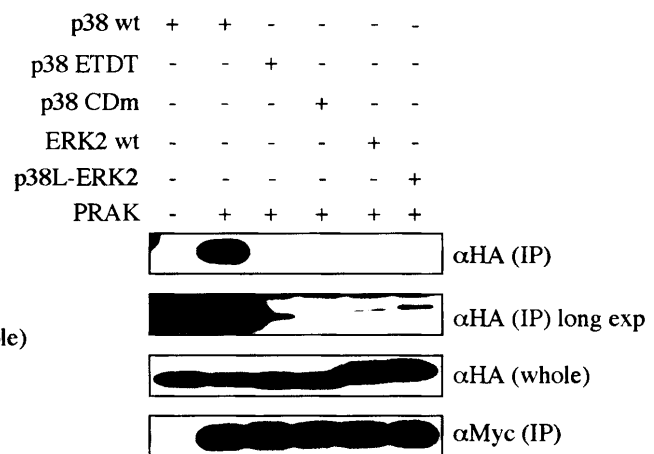
A**B****C****D**

Figure 15, A, p38とMSK2との結合。 p38のwt、ETDT、CDm、allに関してMSK2との結合をみた。**B, p38とERK2のMSK2との結合。** p38のwt、ERKlike-p38、ERK2のwt、p38like-ERK2に関して結合を検討した。**C, ERK2のwt、SD、TETD、p38like-ERK2のMSK2との結合を検討した。****D, p38のETDT、CDm、ERK2のwt、p38like-ERK2とPRAKとの結合を検討した。**

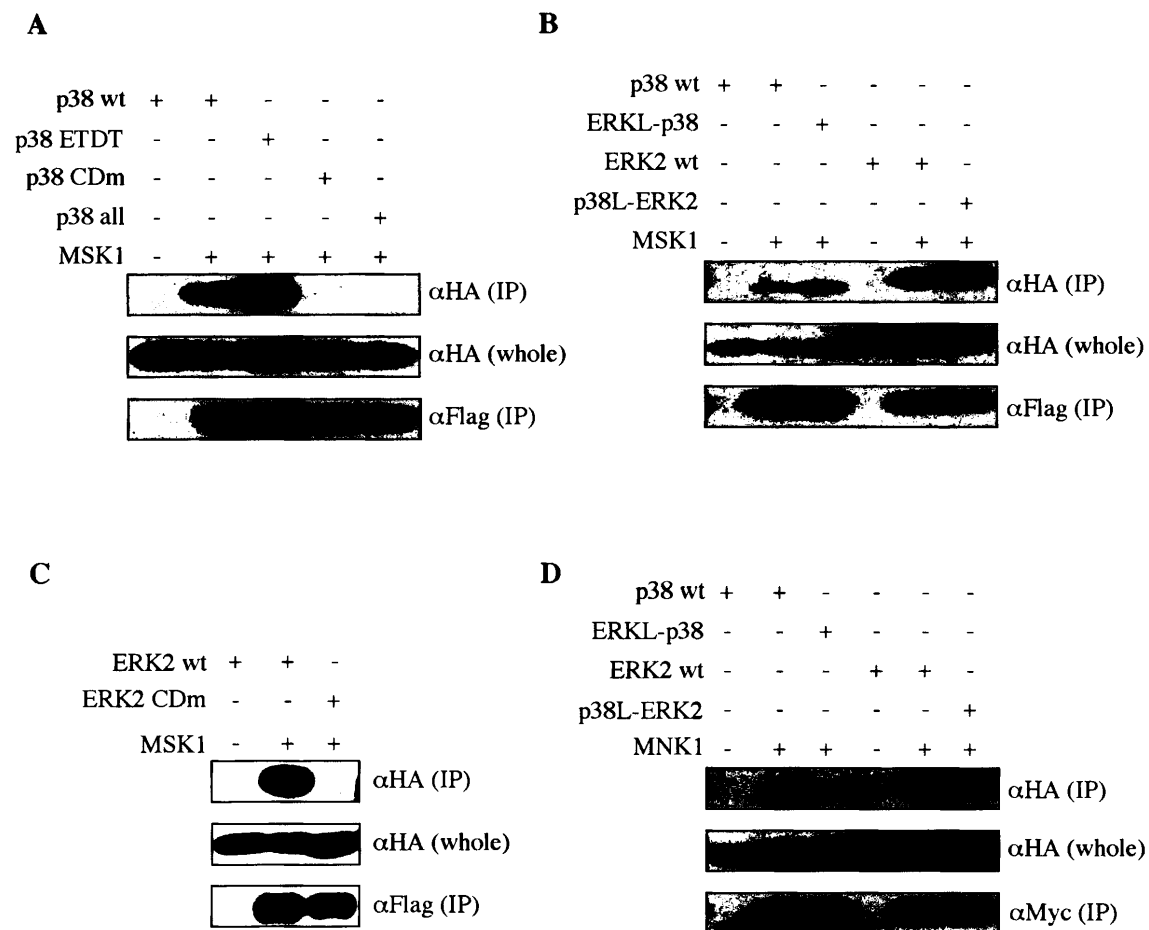
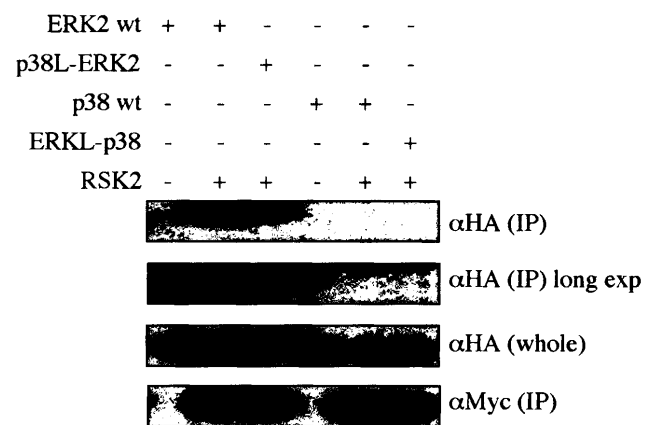


Figure 16, A, p38のwt、ETDT、CDm、allに関してMSK1との結合をみた。**B**, p38とERK2のMSK1との結合。p38のwt、ERKlike-p38、ERK2のwt、p38like-ERK2に関して結合を検討した。**C**, ERK2のwtとCDmのMSK1との結合を検討した。**D**, p38のwt、ERKlike-p38、ERK2のwt、p38like-ERK2とMNK1との結合に関して検討した。

A



B

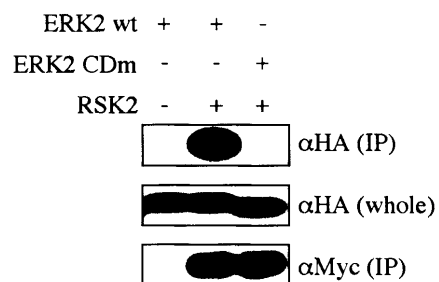


Figure 17, A, ERK2のwt、p38like-ERK2、p38のwt、ERKlike-p38のRSK2との結合を検討した。**B,** ERK2のwtとCDmのRSK2との結合を検討した。

の両方によって活性化される MAPKAPK である MNK1 に関して結合を検討した。野生型の ERK2 および野生型の p38 は MNK1 と結合し、ERKlike-p38 は結合が弱まり、p38likeERK2 は野生型と同じ程度の結合能を持っている (図 16D)。また、ERK2、p38 のいずれの場合も CD domain は結合に重要である (図 4D,7D)。よって、MNK1 と MAP kinase の docking interaction においては p38 との結合においては ED site が必要であるが、ERK2 との結合においては重要な役割を果たしていないと考えられる。

MAPK-phosphatase との docking interaction.

さらに、MAPK-phosphatase に関して、ED site の docking interaction における関与を検討した。ERK2 の野生型は MKP-3 と結合するが、p38like-ERK2 は結合が野生型よりも弱まった。また、野生型および ERK2 様 p38 のいずれも結合がみられなかった (図 18A)。さらに MAP kinase と MKP-5 に関して検討すると、p38 の野生型は MKP-5 と結合し、p38ETDT も同程度に結合した。また、ERK2 の野生型は結合がみられず、p38like-ERK2 は野生型の ERK2 よりは結合がみられた (図 18B)。よって MAP kinase と MKP-3 および MKP-5 との結合においては、CD domain と ED site の負の電荷によって docking interaction の特異性がすべて説明できるわけではないことが示された。さらに、p38 と JNK/SAPK に特異的な MKP である CL100/MKP-1 との結合を検討した。野生型の ERK2 は結合がみられなかったが、p38like-ERK2 は結合した。また、ERK2SD、ERK2TETD、p38like-ERK2 の順に結合が強まった (図 18C)。よって ERK2 と CL100 に関しては CD domain と ED site の負のアミノ酸の数が結合を規定しているといえる。p38 の野生型は結合したが、p38 の CD domain の変異体は結合しなかった (図 18C)。よって CL100 と p38 の結合においても CD domain は必要である。また、

A

ERK2 wt	+	+	-	-	-
p38L-ERK2	-	-	+	-	-
p38 wt	-	-	-	+	-
p38 ETDT	-	-	-	-	+
MKP-3	-	+	+	+	+



αHA (IP)



αHA (IP) long exp



αHA (whole)



αMyc (IP)

B

p38 wt	+	+	-	-	-
p38 ETDT	-	-	+	-	-
ERK2 wt	-	-	-	+	-
p38L-ERK2	-	-	-	-	+
MKP-5	-	+	+	+	+



αHA (IP)



αHA (IP) long exp



αHA (whole)



αMyc (IP)

C

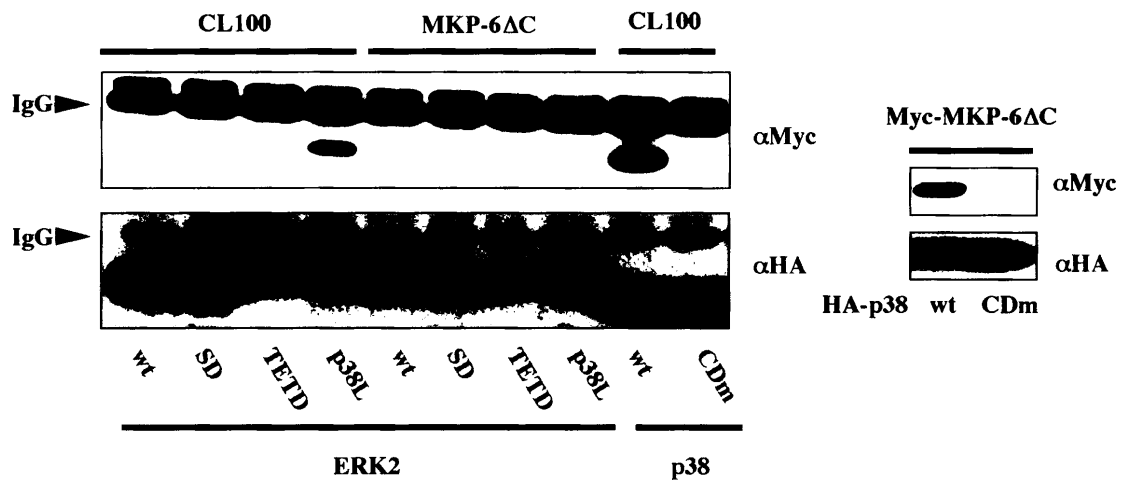


Figure 18, A, ERK2のwt, p38like-ERK2、p38のwt、ETDTとMKP-3の結合に関して検討した。**B**, p38のwt、ETDT、ERK2のwt、p38like-ERK2とMKP-5の結合に関して検討した。**C**, ERK2のwt、SD、TETD、p38like-ERK2のCL100/MKP-1およびMKP-6との結合を検討した。また、p38のwtとCDmのCL100/MKP-1とMKP-6の結合に関して検討した。

新規にクローニングしてきた MKP である、MKP-6 との結合を検討したところ、ERK2 の野生型、ERK2SD、ERK2TETD、p38like-ERK2 のいずれとも結合はみられず、p38 とは結合した。p38 の CD domain の変異体は結合しなかった(図 18C)。よって、MAP kinase と MKP-6 の docking interaction においては CD domain と ED site の負の電荷によって docking interaction の特異性がすべて説明できるわけではないことが示された。

考察

我々は、本研究において、MAP kinase 上の、MAPKK、MAPKAPK、MAPK-phosphatase との docking site を同定し、かつ、MAPKK、MAPKAPK、MAPK-phosphatase 上の MAPK docking site を同定した。いずれの docking site も、酵素の活性中心からは離れた部位に存在する(図 1,2, Table 1)。上記の 3 者上の MAPK docking site はリジンやアルギニンといった正の電荷をもったアミノ酸のクラスターによって特徴づけられ、相同性の高い配列をしている (Table 1)。また、MAP kinase 上の docking site はアスパラギン酸やグルタミン酸といった負の電荷をもったアミノ酸のクラスターによって特徴づけられる (図 2, 3)。この正と負のアミノ酸のクラスターによる静電結合が MAP kinase カスケードにおける docking interaction の性質の一つである。本研究遂行中に MAPKAPK の docking site に関しては別の 2 つのグループからも報告がなされた (Gavin et al. 1999; Smith et al. 1999)。我々は、静電結合の強さ、つまり電荷を持つアミノ酸の数によって結合の特異性が規定される場合として、MAPKAPK-3/3pk、MSK2、CL100 の例を示した。しかし、電荷をもつアミノ酸の数を ERK2 と p38 の間で置換しても docking interaction の特異性が変化しない場合もあり、他のアミノ酸も特異性の決定に必要であることが考えられる。よって我々は CD domain と ED site の周辺のアミノ酸の種類によって docking interaction の性質が変わると考えた。CD domain と ED site を含む領域は groove 状の構造をしていることから、この領域を docking groove と名付けた (図 3,19)。MAP kinase と相互作用する分子の docking site を構成するアミノ酸の違いと docking groove を形成するアミノ酸の種類によって docking interaction の特異性および強度が決定されるものと考えられる。Docking groove 内の負の電荷の数は ERK2 が 3 つで、p38 が 6 つである (図 19)。MAP kinase と相互作用する分子の MAPK docking site 内のアミノ酸を比べてみても、p38 に結合する分子は ERK に結合する分子よりも正の電荷を

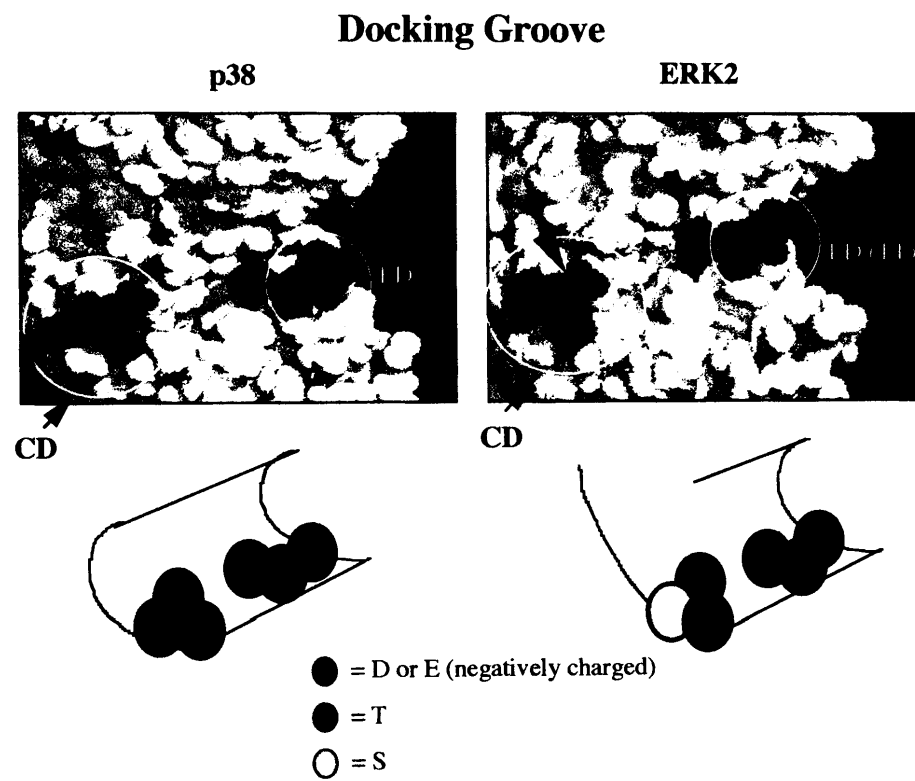


Figure 19, docking grooveの図。黄色の円はCD domainを示し、白の円はED (TT) siteを示す。黄色の矢印はSevenmakerの変異アミノ酸。水色の矢印はLim et al. によって報告された変異部位。

持ったアミノ酸が多い傾向にある (Table 1)。よって、静電結合だけを考えると非常に整合性のあるモデルであるといえる。しかし、多くの MAPKAPK および MKP との docking interaction において MAP kinase 上の静電結合のみを変換しても特異性に变化がみられなかったことから、周辺のアミノ酸の組み合わせで“噛み合わせ”が規定されており、静電結合は結合の強度を補強するものであると考えられる。これは、静電結合を変換して結合の特異性が置換された分子 (3pk、MSK2、CL100) が、過剰量に存在すると特異性が緩むという共通の性質を持っていることと合致する。例えば、CL100 はごく最近まで、ERK 特異的な MKP であると考えられていたが、最近になって、JNK/SAPK および p38 に対する特異性が強いとの認識で一致している (Camps et al. 2000)。この事実をもとに考えてみると、特異性の緩い分子の場合、docking groove にある程度“はまる”ことが可能であり、静電結合の強度を変えることによって結合が強まるものと考えられる。MAP kinase と相互作用する分子上の MAP kinase docking site の配列において、電荷を持つアミノ酸のみではなく、周囲に存在するロイシンやバリン、イソロイシンといった疎水性のアミノ酸のクラスターも保存されていることを考えると (Table 1)、周囲のアミノ酸同士の疎水結合によって“はまり”やすさが規定されている可能性も高い。一般に水溶液中のタンパク質間の結合において、静電結合は短い距離間では非常に強い結合となるが、距離が離れると指数関数的にその強度が弱くなると考えられている。MAP kinase カスケードにおける docking interaction の性質も静電結合の持つこの性質を反映しているものであるかもしれない。いずれにせよ、今後の研究の課題である。MAP kinase と MAPKK、MAPKAPK、MAPK-phosphatase が共通の docking groove を介して相互作用することから、MAP kinase と上記の三者との結合は排他的であると考えられる。つまり、三者のうちの一つづつしか MAP kinase とは結合しないということである。Docking interaction のこの、三者が MAP kinase 上の共通の

部位に結合するという性質が、MAP kinase カスケードにおけるシグナル伝達の流れを規定しているものと考えられる（図 20）。MAPKK から MAP kinase、MAPKAPK というシグナルの流れはそれぞれの分子同士の結合力の違い、および存在量の差によって決定されているものと考えられる。SEK1/MKK4 の N 端の 1-87 番目までの部分が、下流の JNK/SAPK および上流の MAPKKK である MEKK1 との結合部位であるという報告がある（Xia and Karin 1998）。この場合も SEK1/MKK7 との結合は排他的なものであり、MAP kinase カスケードにおいて上流から下流へのシグナルの流れは、MAPKK-MAPK-MAPKAPK の段階のみならず、MAPKKK-MAPKK-MAPK の段階においても、上流の分子と下流の分子が共通の docking site を共有することによって保証されているのではないかと考えられる。

以上のことから、Docking interaction のバランスがくずれるとシグナルの流れ方に変化がおきることが予想される。ERK2 の CD domain 内のアスパラギン酸（D324 (mouse)）がアスパラギンに変異した例がショウジョウバエで報告されている。この変異体は Sevenmaker 変異体と呼ばれており、表現型としては、ERK2 の gain-of-function を示す（Brunner et al. 1994）。従来、gain-of-function の形質の理由としては、ERK2 の、phosphatase による不活性化に対する感受性が低くなったためと考えられていたが（Bott et al 1994; Chu et al. 1996）、この表現型は、docking interaction のバランスが崩れたためにみられるものであると考えることができる。ERK2 の docking groove 内の CD domain 以外のアスパラギン酸（D160）がアスパラギンに変異したショウジョウバエの変異体も報告されており、この変異体の表現型は sevenmaker よりも弱くはあるが、同じ性質の形質を示す（Lim et al. 1996、図 19 参照）。この報告は、docking groove 内の CD domain と ED site 以外のアミノ酸も docking interaction に関与しているという我々の考えを強く支持するものである。ERK2 の D160 に対応する p38 のアミノ酸は D163

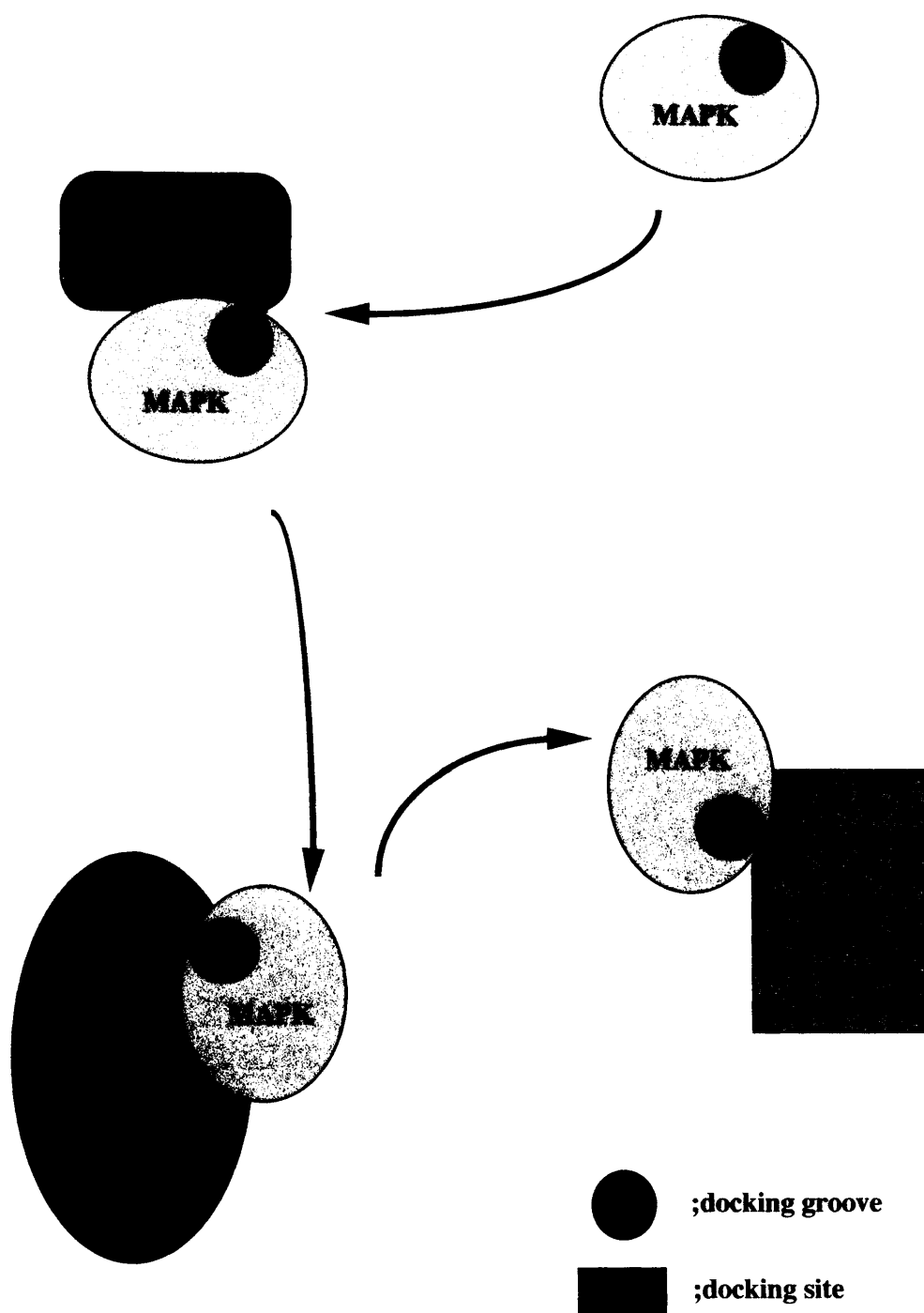


Figure 20, MAP kinase カスケードの情報伝達

であり、ERK2 の場合と同様に分子の表面に露出しており、docking groove 内に存在する (図 19 参照)。また、N 端の docking site が欠失した MKK7 の splicing variant の存在も報告されており (Tournier et al. 1999)、生体内において、docking interaction による酵素反応の制御機構が存在することを強く示唆する。同様な例として、Docking site の modification による MAP kinase カスケードの制御の例も報告されている。PTP-SL、STEP といった tyrosine-phosphatase が存在するが、これらの docking site は PKA によるリン酸化配列と一致しており、PKA によってリン酸化されると MAP kinase に対する docking 能を失う。さらに、MAP kinase を不活性化する分子として dual specificity phosphatase と tyrosine phosphatase 以外に PP2C と VHR が報告されているが PP2C と VHR には MAPK-docking site が存在しない。Docking site を持っている分子と持っていない分子との酵素反応における差異に関して、今後の研究を待つ。

MAP kinase カスケードにおける docking interaction は酵素反応の効率および特異性を規定するのみならず、カスケードを構成する分子の細胞内局在も規定する。MEK1 の N 端側の 1-32 アミノ酸は、ERK2 の docking site であるが、この docking site を介して MEK1 は ERK2 を細胞質にアンカーしている。刺激がはいると ERK2 は MEK1 から離れ、核へと移行する (Fukuda et al. 1997)。また、本研究によって MAPKAPK-3/3pk の C 端の MAPK docking site は NLS としての機能も持っており、p38 が結合することによって 3pk の細胞内局在が変化することが明かとなった。生体内では p38 と 3pk の存在量によって 3pk の細胞内局在は規定されるものと考えられる。また、MKP-3 も細胞に強発現すると ERK2 の細胞質アンカーとしての機能を果たすことが報告されている。また、ERK2 の核移行のモデルのひとつとして、核内アンカー説があるが、核内のアンカーの候補として転写因子が挙げられており、この場合、docking interaction が ERK2 の核内局在までも規定していると考えられる。

MAP kinase には MAPKAPK 以外にも転写因子をはじめ、多くの基質があるが、MAPKAPK 以外の基質、転写因子における docking interaction に関して報告がある。転写因子においても、正の電荷を持つアミノ酸のクラスターおよび疎水性のアミノ酸のクラスターによって特徴づけられ、MAP kinase によるリン酸化部位から離れた位置に存在する。いずれも MAP kinase によるリン酸化に必要であることが報告されている (Kallunki et al. 1996; Yang et al. 1998; Yang et al. 1999)。一般に、kinase の基質認識はそのリン酸化配列周辺のアミノ酸によって決定され、電荷をもったアミノ酸によって認識配列は特徴づけられることが多い。例えば、Akt/PKB のリン酸化認識配列は RXXRXXR-S/T-Hyd であり (Alessi et al. 1996)、Cdk ファミリーは S/TPXR/K をリン酸化し、カゼインキナーゼの場合は負の電荷を持つアミノ酸のクラスターがリン酸化配列の周辺に存在する (Pinna et al. 1996)。MAP kinase の場合、リン酸化部位の配列は PXS/TP もしくは S/TP であり、電荷を持ったアミノ酸が存在しない (Clark-Lewis et al. 1991)。よって、MAP kinase カスケードにおいては、電荷を持つアミノ酸によって構成される docking groove を介する docking interaction が基質認識の一部を担っているものと考えられる。

MAP kinase カスケードにおけるシグナル伝達の効率および特異性を規定する役割を果たすものとして、近年、scaffold protein (足場タンパク質) の存在が報告されている。酵母においては STE5 が足場タンパク質としてはたらき、哺乳類においては JNK/SAPK の pathway における JIP/JSAP と ERK の pathway における MP-1 が報告されている (Whitmarsh et al. 1998; Whitmarsh and Davis 1998; Ito et al. 1999; Yasuda et al. 1999; Schaeffer et al. 1998)。JIP は JNK/SAPK に対する two-hybrid screening によってクローニングされたタンパク質であり、MAPKKK である MLK-3 と MAPKK である SEK1 と JNK/SAPK の三者と結合すると報告されている。共発現の系において JIP 存在下で JNK/SAPK の活性化の効率が上

がることから、scaffold protein として働くと報告された (Whitmarsh et al. 1998; Ito et al. 1999; Yasuda et al. 1999)。ごく最近になってショウジョウバエにおいて JIP-3/JSAP-1 (Sunday Driver) が axonal transport において小胞と kinesin を繋ぐタンパク質であるという報告がなされ、JNK/SAPK の scaffold protein としての機能には疑問がある (Bowman et al. 2000)。MP-1 の機能も、今後の研究がまたれる。また、ごく最近になって、 β -arrestin が三量体 G タンパク質の下で MAPKKK である ASK1 と MKK7 および JNK3 の scaffold protein として機能するという報告がなされた (McDonald et al. 2000)。また、MAPKKK の一つである MEKK1 が、kinase domain 以外の部分で MAP kinase の JNK/SAPK に結合するという報告、および MAPKKK である MEKK2 が MAPKK である MKK7 と MAP kinase の JNK1 と結合するという報告があり、シグナル伝達分子の三者複合体もあり得ることが示唆されるが、結合することがすなわち酵素活性を制御することではなく、基質である可能性も十分あり、今後の研究が待たれる (Xu and Cobb 1997; Cheng et al. 2000)。酵母においては、MAPKK である STE7 が kinase domain 外で MAPKKK である STE11 と MAPK である Hog1 と結合し、scaffold として働くことが知られている (Whitmarsh and Davis 1998)。

一般に、scaffold protein の機能としては3つの働きが考えられる。一つは酵素反応の効率を上げる、もう一つは酵素反応の特異性を規定する。三つめは分子の細胞内局在を規定することである。MAP kinase カスケードにおいて酵素反応の特異性は MAPKK と MAPK の間では厳密に規定されており、scaffold protein の必要性を仮定するのは難しい。しかし、MAPKKK と MAPKK の間に関しては、細胞に共発現して活性化を量る、もしくは in vitro における活性化をみる限りでは、MAPKKK は MAPKK に対する特異性が MAPKK と MAPK の関係ほどには厳密に規定されているわけではないので、scaffold protein の存在も仮定し得る。また、MAP kinase のサブファミリー、つまり JNK1、2、3 もしくは p38 α 、

β 、 γ 、 δ 、の間での MAPKK、基質の特異性の決定もしくは酵素反応の効率に関する scaffold protein の存在は可能性が大きい。なぜなら、p38 α 、 β 、 γ 、 δ 、の間で、MKK3、MKK6 による活性化の効率が異なることが報告されているからである (Cuenda et al. 1997; Goedert et al. 1997; Nebreda and Porras 2000)。いずれにせよ、ある MAP kinase pathway の活性化において、あらゆる状況で必要とされるような scaffold protein の存在は仮定しがたいが、細胞内の状況に応じて scaffold protein が存在して酵素反応を助ける場合と、本研究における docking interaction による情報伝達が主な役割を果たす場合と、2種類あると考えられる。細胞はこの2つの方法で MAP kinase カスケードの正確な情報の受け渡しを規定し、様々な状況に対応している (図 21)。

酵素の基質認識においては、たとえば、PP2A には多種類の co-factor が存在し、それらを介して基質を認識する (Millward et al. 1999)。また、PDK1 には PKA や PKC や PRK といった基質を認識する部位 (hydrophobic pocket) があり、酵素の活性中心とは少し離れた部分に存在する (Ricardo et al. 2000; Balendran et al. 2000)。酵素と基質認識において、酵素の活性中心を介する相互作用とは違いかたちの相互作用が一般に使用されているのかは不明であるが、今後、MAP kinase カスケードにおける docking interaction のような例の報告が増えることと思う (図 21)。

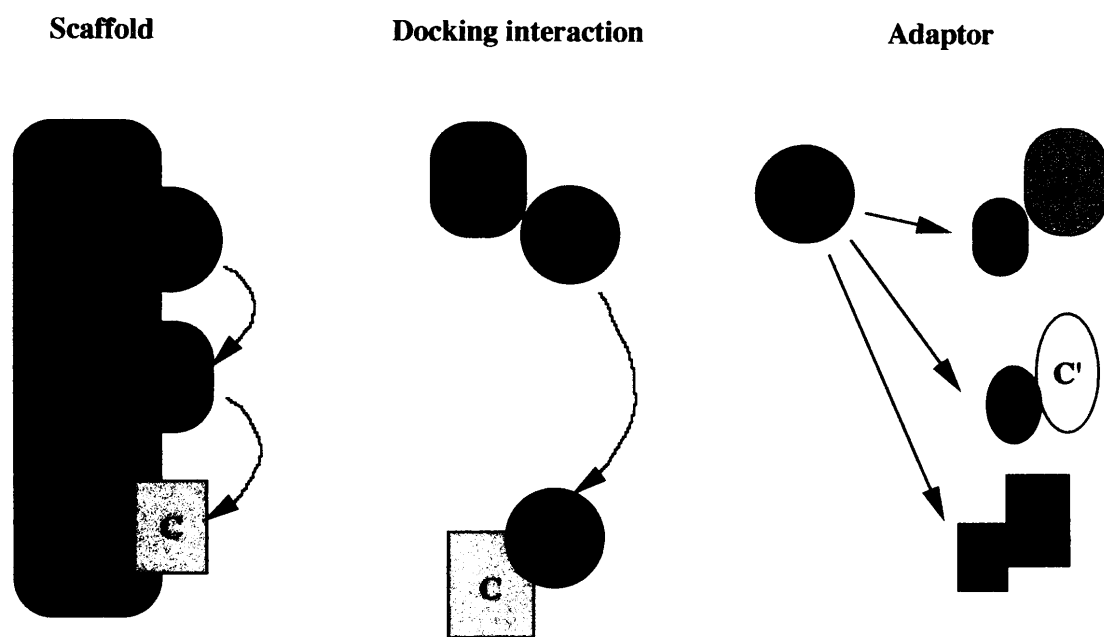


Figure 21, 細胞内情報伝達のシステム

引用文献

- Alessi,D.R., Caudwell,F.B., Andjelkovic,M., Hemmings,B.A. and Cohen,P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* **399**, 333-338
- Ahn,N.G., Seger,R. and Krebs,E.G. (1992). The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 992-999.
- Balendran,A., Biondi,R.M., Cheung,P.C.F., Casamayor,A., Deak,M. and Alessi,D.R. (2000). A PDK1 docking site is required for the phosphorylation of PKC ζ and PRK2 by PDK1. *J. Biol. Chem.* **275**, 36324-36333
- Bardwell,L. and Thorner,J. (1996). A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 373-374.
- Ben-Levy,R., Hooper,S., Wilson,R., Paterson,H.F. and Marshall,C.J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.* **8**, 1049-1057.
- Bott,C.M., Thorneycroft,S.G. and Marshall,C.J. (1994). The sevenmaker gain-of-function mutation in p42 MAP kinase leads to enhanced signalling and reduced sensitivity to dual specificity phosphatase action. *FEBS Lett.* **352**, 201-205
- Bowman,A.B, Kamal,A., Ritchings,B.W, Philp,A.V., McGrail,M., Gindhart,J.G. and Goldstein,L.S.B. (2000). Kinesin-Dependent Axonal Transport Is Mediated by the Sunday Driver (SYD) Protein. *Cell* **103**, 583-594.
- Brunner,D., Oellers,N., Szabad,J., Biggs,W.H., Zipursky,S.L. and Hafen,E. (1994). A gain-of-function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* **76**, 875-888.
- Brunet,A. and Pouyssegur,J. (1996). Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. *Science* **272**, 1652-1655.

- Camps,M., Nichols, A. and Arkinstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* **14**, 6-16
- Cheng,J., Yang,J., Xia,Y., Karin,M. and Su,B. (2000). Synergistic Interaction of MEK Kinase 2, c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Kinase 2, and JNK1 Results in Efficient and Specific JNK1 Activation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2334-2342.
- Chu,Y., Solski, P.A, Khosravi-Far,R., Der,C.J. and Kelly,K. (1996) The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem.* **271**, 6497-6501.
- Clark-Lewis,I., Sanghera,J.S. and Pelech,S.L. (1991). Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J. Biol. Chem.* **266**, 15180-15184.
- Cuenda,A., Cohen,P., Scherrer,V.B. and Goedert,M. (1997). Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* **16**, 295-305.
- Deak,M., Clifton,A.D., Lucocq,L.M. and Alessi,D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* **17**, 4426-4441.
- Engel, K., Kotlyarov,A. and Gaestel,M. (1998). Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.* **17**, 3363-3371.
- Enslin,H., Brancho,D.M. and Davis.R.J. (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J.* **19**, 1301-1311.
- Fukuda,M., Gotoh, Y. and Nishida,E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* **16**, 1901-1908.

- Fukunaga,R. and Hunter,T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* **16**, 1921-1933.
- Gavin,A.C. and Nebreda, A.R. (1999). A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90RSK/MAPKAPK-1. *Curr. Biol.* **9**, 281-284.
- Goedert,M., Cuenda,A., Craxton,M., Jakes,R. and Cohen,P. (1997). Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* **16**, 3563-3571.
- Gonzalez,F.A., Raden,D.L. and Davis.R.J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem* **266**, 22159-22163.
- Holland,P.M. and Cooper,J.A. (1999). Protein modification: docking sites for kinases. *Curr. Biol.* **9**, 329-331.
- Hunter,T. (2000). Signaling—2000 and Beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Ip,Y.T. and Davis,R.J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205-219.
- Ito,M., Yoshioka,K., Akechi,M., Yamashita,S., Takamatsu,N., Sugiyama,K., Hibi,M., Nakabeppu,Y., Shiba,T. and Yamamoto,K. (1999). JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol.* **19**, 7539-7548.
- Jacobs,D., Glossip,D. Xing,H., Muslin,A.J. and Kornfeld,K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins from a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev.* **13**, 163-175.
- Kallunki,T., Deng,T. Hibi,M. and Karin,M. (1996). c-Jun recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* **87**, 929-939.

- Keyse, S.M.(2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol.* **12**, 186-192.
- Kosako,H., Nishida,E. and Gotoh,Y. (1993). cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *EMBO J.* **12**, 787-794.
- Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *Bioessays* **18**, 567-577.
- Lim,Y.M., Nishizawa,K., Nishi,Y., Tsuda,L., Inoue,Y.H. and Nishida,Y. (1999). Genetic analysis of rolled, which encodes a Drosophila mitogen-activated protein kinase. *Genetics* **153**, 763-771.
- Marshall,C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185.
- McDonald,P.H, Chow,C., Miller,W.E., Laporte,S.A., Field,M.E., Lin,F., Davis,R.J. and Lefkowitz,R.J. (2000). β -Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3. *Science* **290**, 1574-1577.
- Millward,T.A., Zolnierowicz,S. and Hemmings,B.A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 186-191.
- Moriguchi,T., Kuroyanagi,N., Yamaguchi,K., Gotoh,Y., Irie,K., Kano,T., Shirakabe,K., Muro,M., Shibuya,H., Matsumoto,K., Nishida,N. and Hagiwara,M. (1996). A Novel Kinase Cascade Mediated by Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* **271**, 13675-13679.
- Moriguchi,T., Toyoshima,F., Masuyama,N., Hanafusa,H., Gotoh,Y. and Nishida,E. (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF and cellular stresses. *EMBO J.* **16**, 7045-7053.
- Muda,M., Theodosiou,A., Gillieron,C., Smith,A., Chabert,C., Camps,M., Boschert,U., Rodrigues,N., Davies,K., Ashworth,A. and Arkinstall,S. (1998). The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *J. Biol. Chem.* **273**, 9323-9329.

- Muda,M., Boschert,U., Dickinson,R., Martinou,J.C., Martinou,I., Camps,M., Schlegel,W. and Arkinstall,S. (1996). MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J. Biol. Chem.* **271**, 4319-4326.
- Nebreda,A.R.and Porras,A. (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* **25**, 257-260.
- New,L., Jiang,Y., Zhao,M., Liu,K., Zhu,W, Flood,L.J., Kato,Y., Parry,G.C. and Han,J. (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J.* **17**, 3372-3384.
- New,L., Zhao,M., Li,Y., Bassett,W.W., Feng,Y., Ludwig,S., Padova,F.D., Gram,H. and Han,J. (1999). Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 1026-1032.
- Nishida,E. and Gotoh,Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 128-131.
- Nguyen,A.N. and Shiozaki,K. (1999) Heat shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev.* **13**, 1653-1663.
- Pawson,T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580.
- Pawson,T. and Nash,P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* **14**, 1027-1047.
- Pierrat,B., Correia,J.S., Mary,J.L., Tomas-Zuber,M. and Lesslauer,W. (1998). RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J. Biol. Chem.* **273**, 29661-29671.
- Pinna,L.A. and Ruzzene,M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates ?. *Biochimica et Biophysica Acta* **1314**, 191-225.
- Pritchard,C.A., Samuels,M.L., Bosch,E. and McMahon,M. (1995). Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6430-6442.

- Pulido,R., Zuniga,A. and Ullrich,A. (1998). PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J.* **17**, 7337-7350.
- Ricardo,M., Biondi,R.M.F., Cheung,P.C., Casamayor,A., Deak,M., Currie,R.A. and Alessi,D.R. (2000). Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J.* **19**, 979-988.
- Robinson,M.J. and Cobb,M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180-186.
- Schaeffer,H.J., Catling,A.D., Eblen,S.T., Collier,L.S., Krauss,A., Weber,M.J.(1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**, 1668-1671.
- Schaeffer,H.J. and Weber,M.J. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435-2444.
- Shiozaki,K. and Russell,P. (1995) Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in osmoregulation of fission yeast. *EMBO J.* **14**, 492-502.
- Smith,J.A, Poteet-Smith,C.E., Malarkey,K. and Sturgill,T.W. (1999). Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J. Biol. Chem.* **27**, 2893-2898.
- Sturgill,T.W. and Wu.J. (1991). Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim. Biophys. Acta* **1092**, 350-357.
- Takekawa,M., Maeda,T. and Saito,H. (1998) Protein phosphatase 2C inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J.* **17**, 4744-4752.
- Takekawa,M., Adachi,M., Nakahata,A., Nakayama,I., Itoh,F., Tsukuda,H., Taya,Y. and Imai,K. (2000). p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* **19**, 6517-6526.
- Tanoue,T., Moriguchi,T. and Nishida,E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *J. Biol. Chem.* **274**, 19949-19956.

- Tournier,C., Whitmarsh,A.J., Cavanagh,J., Barrett,T. and Davis,R.J. (1999). The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol.* **19**, 1569-1581.
- Treisman,R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 205-215.
- Wang,Z., Canagarajah,B.J. Boehm,J.C. Kassisa,S. Cobb,M.H. YoungP.R., Abdel-Meguid,S. Adams,J.L. and Goldsmith,E.J. (1997). The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **94**, 2327-2332.
- Waskiewicz,A.J., Flynn,A., Proud,C.G. and Cooper,J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* **16**, 1909-1920.
- Whitmarsh,A.J., Cavanagh,J., Tournier,C., Yasuda,J. and Davis,R.J. (1998). A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**,1671-1674.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci.* **23**, 481-485.
- Wilsbacher,J.L., Goldsmith,E.J. and Cobb,M.H. (1999). Phosphorylation of MAP kinases by MAPK/ERK kinases involves multiple regions of MAP kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 16988-16994.
- Wilson,K.P., Fitzgibbon,M.J. Caron,P.R., Griffith,J.P. Chen,W., McCaffrey,P.G., Chambers,SP. and Su,M.S. (1996). Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27696-2700.
- Xia,Y. and Karin,M. (1998). JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev.* **12**, 3369-3381.
- Xie,X., Gu,Y., Fox,T., Coll,J.T., Fleming,M.A., Markland,W., Caron,P.R., Wilson,K.P. and Su,M.S. (1998) Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure* **15**, 983-991.

- Xu,S. and Cobb,M.H. (1997). MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. *J Biol Chem.* **272**, 32056-32060.
- Yang,S.H., Whitmarsh,A.J., Davis,R.J.and Sharrocks,A.D. (1998). Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* **17**, 1740-1749.
- Yang,S.H., Galanis,A. and Sharrocks,A.D. (1999). Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4028-4038.
- Yasuda,J., Whitmarsh,A.J., Cavanagh,J., Sharma,M. and Davis,R.J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol.* **19**, 7245-54.
- Zuniga,A., Torres,J., Ubeda,J. and Pulido,R. (1999). Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **274**, 21900-21907.
- Zhang,F., Strand,A., Robbins,D., Cobb,M.H. and Goldsmith,E.J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**, 704-711.

謝辞

指導教官である西田栄介教授に深く感謝します。実験上の相談にのっていただいた森口徹生博士および CD domain の研究における共同研究者である足立誠君に心から感謝します。また、修士課程の半年間指導していただいた後藤由季子博士に感謝します。